

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	デマート* (参考)
C 0 7 K 14/82		C 0 7 K 14/82	
16/18		16/18	
19/00		19/00	
// A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 9/10		A 6 1 P 9/10	
審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 126 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2002－164988(P2002－164988)	(71) 出願人	591123773
(62) 分割の表示	特願平8－504299の分割		ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバ
(22) 出願日	平成 7 年 6 月 7 日 (1995. 6. 7)		ーシティ オブ テキサス システム
			アメリカ合衆国 テキサス 78701 オー
(31) 優先権主張番号	0 8 / 2 7 3 , 5 6 7		スチン ウェスト セブンス ストリート
(32) 優先日	平成 6 年 7 月11日 (1994. 7. 11)		201
(33) 優先権主張国	米国 (U S)	(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策 (外 2 名)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 血管系の特異的凝固のための方法および組成物

(57) 【要約】

【課題】 特異的凝固、例えば、腫瘍血管系中の凝固を達成する使用のための、副作用が制限された新規な組成物および方法を提供することによる、先行技術の制限を克服、および特定の血液凝固の達成に使用される種々の組成物および方法の提供。

【解決手段】 以下の (a) および (b) : (a) 疾患細胞、疾患関連血管系の成分、または疾患関連支質の成分に結合する第 1 結合領域 ; 該第 1 結合領域が作動可能に連結した、(b) 凝固因子、または凝固因子に結合する第 2 結合領域、を含むリガンド。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 図5に示される構造を有する結合リガンド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一般に、血管および凝固の分野に関する。より詳細には、本発明は、特異的凝固を達成する使用のための、二重特異性抗体を含む種々の増殖因子ベースの試薬および免疫学的試薬を提供する。

【0002】

【従来の技術】過去30年間の間に、新生物形成疾患の化学療法における進歩が実現されてきた。これは、新しい化学療法剤の開発、より詳細には、薬物の同時投与のための処法の開発におけるいくつかの進歩を含む。細胞レベルおよび組織レベルにおける新生物形成のプロセス、および基礎となる抗新生物形成剤の作用のメカニズムに対する重要な理解もまた、絨毛膜ガン腫、ウィルムス腫瘍、急性白血病、横紋筋腫、網膜芽腫、ホジキン病およびバーキットリンパ腫を含む、多くの新生物形成疾患の化学療法の進歩を可能にしてきた。いくつかの腫瘍において進歩がなされてきたが、ヒトガンの最も普通の形態の多くはまだ、有効な化学療法の介入に抵抗している。

【0003】いずれの処置処法でも言及しなければならない重要な根本的な問題は、「全細胞殺傷」の概念である。この概念は、有効な処置処法を有するために、それが外科的アプローチまたは化学療法的アプローチのいずれかまたはその両方であるかどうかにかかわらず、全てのいわゆる「クローン原性」悪性細胞の全細胞殺傷が存在しなければならないこと、すなわち、制御されずに増殖しそして任意の腫瘍塊に入れ替える能力を有する細胞が除去され得ることを確保する。全細胞殺傷を実現する治療剤および治療処法を開発する究極の要求のためには、特定のタイプの腫瘍が他の腫瘍より治療しやすい。例えば、軟組織腫瘍（例えば、リンパ腫）、および血液および血液形成器官の腫瘍（例えば白血病）は、一般に、化学療法治療に対してガン腫のような固形腫瘍よりも応答しやすい。

【0004】化学療法に対する軟組織腫瘍および血液ベースの腫瘍のこの感受性についての1つの理由は、化学療法的介入に対してリンパ球および白血球が物理的に接近しやすいからである。単純な投与では、大部分の化学療法剤は固形腫瘍塊の全ての細胞に到達することが軟腫瘍および血液ベースの場合よりもはるかに難しく、そしてそれゆえ全細胞殺傷を達成することがはるかに難しい。化学療法剤の投与量を増大することにより、しばしば、毒性副作用が生じる。これは、一般に従来の抗腫瘍剤の有効性を制限する。

【0005】成功した抗腫瘍剤を開発する戦略は、腫瘍

細胞を選択的に殺すが、正常な組織に対しては、存在しても比較的小さな不都合な作用しか示さない薬剤の設計を含む。新生物形成組織と正常組織との間には定性的相違がほとんどないため、この目標の達成は困難である。このために、多年にわたって多くの研究は、化学療法および診断の両方のための免疫学的標的として供し得る腫瘍特異的「マーカー抗原」を同定することに集中してきた。多くの腫瘍特異的、または準腫瘍特異的（「腫瘍関連の」）マーカーが、特異的抗体により認識され得る腫瘍細胞抗原として同定されてきた。不幸にも、一般に、腫瘍特異的抗体それ自体は、基本的にガン治療に有用であるように十分な抗腫瘍効果を発揮しない。

【0006】つい最近、イムノトキシンが、ガン細胞を選択的に標的とする試みに利用された。イムノトキシンは、特異的な標的化剤、代表的には腫瘍特異的な抗体またはフラグメント（fragment）と細胞毒性剤（例えば、トキシン部分）との接合体（conjugate）である。標的化剤は、標的にされた抗原を有する細胞にトキシンを向け、そしてこれらの細胞を殺すように設計される。「第2世代」のイムノトキシン、例えば、脱グリコシル化されたりシンA鎖を利用して肝臓によるイムノトキシンの取り込みを防ぎ、そして肝臓毒性を低減するような（Blakeyら、1987a；b）、およびイムノトキシンにインビボでより高い安定性を与える新しい架橋剤を有するような（Thorpeら、1988）イムノトキシンが、現在開発されている。

【0007】イムノトキシンは、マウス（Thorpeら、1988；Ghetieら、1991；Griffinら、1988a；b）およびヒト（Vitettaら、1991）におけるリンパ腫および白血病を処置する際に有効であった。しかし、リンパ系新形成は、腫瘍細胞が血液で運ばれるイムノトキシンに比較的に接近しやすいため、特に、イムノトキシン療法を受けやすい。また、正常なリンパ球抗原を標的にすることも可能である。なぜなら、治療の間に悪性細胞とともに殺される正常なリンパ球は、標的抗原を欠く始原細胞から迅速に再形成されるからである。

【0008】リンパ腫におけるこれらの効果とは対照的に、イムノトキシンは固形腫瘍の処置において相対的に有効ではない（Weinerら、1989；Byersら、1989）。これに対する主な理由は、固形腫瘍が一般に抗体サイズ分子に対して不透過性であることである：注入投与量/g腫瘍の0.001%未満の比取込み値はヒトの研究にはまれではない（Sandsら、1988；Epenetosら、1986）。別の重要な問題は、抗原欠損変異体がイムノトキシンによる殺傷からのがれ、そして再増殖し得ることである（Thorpeら、1988）。

【0009】さらに、腫瘍塊に侵入する抗体は、いくつ

かの理由により均一に分布しない。第1に、腫瘍細胞の密なパッキングおよび繊維状の腫瘍支質が、高分子輸送に対して圧倒的な物理的バリアーを示し、そしてリンパ球による排出がないことと組み合わせられて、腫瘍コアで浸出および液体対流を低減する高い割り込み圧力を作り出す (Baxterら、1991; Jain、1990)。第2に、大部分の腫瘍における血管の分布は、組織化されておらずかつ不均一であり、これにより、いくつかの腫瘍細胞は、大きな拡散距離により、浸出する抗体から分離される (Jain、1990)。第3に、腫瘍に侵入する抗体の全てが、脈管周囲領域において、最初に遭遇する腫瘍細胞により吸着され得、より遠い部位の腫瘍細胞に到着するものをなくする (Baxterら、1991; Kennelら、1991)。

【0010】従って、固形腫瘍の処置のための新規戦略の開発に対する顕著な必要性が存在することは明らかである。1つのアプローチは、腫瘍細胞よりもむしろ腫瘍の血管系に薬剤を標的化することを含む。固形腫瘍の増殖は、腫瘍の血管形成に高度に依存し、そして腫瘍細胞の増殖は、酸素、栄養素および他の増殖因子の供給、および代謝産物の流出が満足される場合のみ維持され得る。実際、多くの現存する療法は、それらの作用の一部として、血管媒介の作用メカニズムを有し得ることが既に観察されている (Denekamp、1990)。

【0011】本発明者らは、血管系を標的にすることは、腫瘍から生命維持事象を奪い、そして腫瘍の増殖速度を低下させ、または腫瘍細胞の死をもたらすようであることを提案する。このアプローチは、腫瘍細胞を直接標的にすることに対していくつかの利点を与えることが期待される。第1に、標的細胞は、静脈内投与された治療剤に直接に接近し得、それにより、注入された投与量の高い割合を迅速に局在化することを可能にする (Kennesら、1991)。第2に、毛細管のそれぞれが腫瘍を取り込む「コード (cord)」中で数千の細胞に酸素および栄養素を提供するため、腫瘍血管系に対する限られた損傷でさえ、腫瘍細胞死の雪崩を生じる (Denekamp、1990; Denekamp、1984)。最後に、標的抗原を欠く変異体内皮細胞の外殖 (outgrowth) は有りそうもない。これらは正常細胞だからである。

【0012】現時点では、腫瘍血管の標的化を成功させるため、正常組織中の内皮細胞ではなく、腫瘍の内皮細胞を認識する抗体が必要であることが一般に受け入れられている。数種の抗体が開発されたが (Duijvestijnら、1987; Hagemeyerら、1986; Brulandら、1986; Murrayら、1989; Schlingemannら、1985)、いずれも高度な特異性を示さなかった。また、血管を標的にする抗体接合体中の第2の薬剤として有望な任意の特定の薬剤は、上記トキシン以外には報告されていないよ

うである。従って、不幸にも、血管を標的にすることは一定の理論的利点を示すが、これらの利点を取り込む有効な戦略はまだ開発されていない。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、特異的凝固、例えば、腫瘍血管系中の凝固を達成する使用のための、副作用が制限された新規な組成物および方法を提供することにより、先行技術の制限を克服する。本発明は、一般のおよび全体的意味では、疾患に関連する血管系中の凝固を刺激し得る種々の新規な免疫学的因子および増殖因子ベースの二重特異性組成物、ならびにこれらの調製方法および使用方法を提供する。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明は、一般に「二重特異性結合リガンド」として記載され得る結合リガンドを提供する。このようなリガンドは、代表的には、疾患と関連する標的細胞 (例えば、腫瘍細胞)、またはこのような細胞と関連する成分; 疾患と関連する血管系 (例えば、腫瘍血管系) に関連する特定の成分; あるいは疾患と関連する支質の成分またはそれと関連する成分に結合する「第1結合領域」を含む。第1結合領域は、凝固因子それ自身であり得るか、または凝固因子に結合し得る第2結合領域であり得る「凝固剤」と作動可能に会合するかまたは連結される。

【0015】本発明の結合リガンドは、「二重特異性」として記載される。なぜなら、これらは「少なくとも」二重特異性であり、すなわち、これらは最小でも2つの機能的に異なる領域を含むからである。他の構築物 (例えば、三重特異性および多重特異性の結合リガンド) を使用する組成物および方法もまた、本発明の範囲内に含まれる。本明細書中に記載の二重特異性凝固リガンドを、他のエフェクター (例えば、他の免疫学的因子および増殖因子ベースの組成物、抗原誘発剤、免疫刺激剤、免疫抑制剤、化学療法薬物など) とともに使用する、組み合わせ組成物、キットおよび方法もまた意図される。

【0016】第1結合領域および任意の第2結合領域は、抗体またはそのフラグメントであり得る。本明細書中で使用される用語「抗体」とは、任意の免疫学的結合剤 (例えば、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgE) を広く意味することが意図される。一般に、IgGまたはIgMが好ましい。なぜなら、これらは、生理学的状態で最も一般的な抗体であり、そしてこれらは実験室設定中で最も容易に作製されるからである。モノクローナル抗体 (MAb) は、一定の利点 (例えば、再生産性および大規模生産) を有し、そしてそれらの使用が一般に好ましいことが認識されている。操作された抗体 (例えば、組換え抗体およびヒト化された抗体) もまた、本発明の範囲内に入る。

【0017】抗体の抗原結合領域が結合および標的化剤として利用される場合、完全な抗体分子が利用され得

る。あるいは、抗体のFv、scFv（一重鎖Fv）、Fab'、Fab、DabまたはF(ab')₂フラグメントにより例示されるように機能的な抗原結合領域が使用され得る。種々の抗体ベースの構築物を調製および使用する技術は、該当分野で周知であり、そして本明細書にさらに記載されている。

【0018】結合リガンドの凝固因子部分は、それが有意な機能的な能力を維持するように形成され、すなわち、結合リガンドの凝固因子部分は、標的領域に送達される時に、それがまだ血液凝固または血餅形成を促進するその能力を保持するような形態である。しかし、特定の実施態様では、結合リガンドの凝固因子部分は、例えば、コアギュラントの天然の相応物よりも活性が少なく、そしてこの因子は、標的領域への送達に際してのみ所望のレベルの活性を達成する。このような例の1つは、G1a改変を欠くビタミンK依存性凝固因子であるが、これは、膜環境への二重特異性リガンドの第1結合領域の結合に際して有意な機能的活性を達成する。

【0019】第2結合領域が凝固因子に結合するために使用される場合、これは、一般に、凝固を誘導するその能力を有意に損害しない凝固因子上の部位を認識するように選択される。同様に、凝固因子が第1結合剤に共有結合する場合、その機能的凝固部位と異なる部位が、一般に、分子を連結するために使用される。

【0020】本発明の二重特異性リガンドの「第1結合領域」は、指定の標的部位、すなわち、凝固が必要とされる腫瘍領域または他の疾患部位と関連する部位に結合する任意の成分であり得る。標的分子は、腫瘍を標的にする場合、一般に、腫瘍部位中では非腫瘍部位中よりも高い濃度で存在する。特定の好ましい実施態様では、標的分子は、腫瘍細胞、腫瘍血管細胞、腫瘍関連支質、または他の成分と関連するかどうかにかかわらず、このような細胞または他の腫瘍関連の実体に制限される。しかし、これは、本発明の要件ではない。

【0021】この点に関して、腫瘍血管系は、「プロトロンボチック（prothrombotic）」であり、そして凝固する傾向にあることに注意されべきである。従って、標的コアギュラントは、腫瘍血管系を優先的に凝固させるが、たとえ他の正常細胞または体成分、特に、正常な内皮細胞または支質でさえもが標的分子の有意なレベルを発現しても、正常組織の血管系を凝固させないことが意図される。従って、このアプローチは、例えば、ガンの処置手段として、ヒトでの使用が、腫瘍血管系にトキシンを標的づける使用よりも安全であると考えられる。

【0022】特定の実施態様では、本発明における使用のために意図される第1結合領域は、腫瘍細胞成分または腫瘍細胞と関連する成分に関し得る。一般に、腫瘍細胞を標的にする際、第1結合リガンドは、二重特異性結合リガンドの凝固因子成分を、血管に最も近い血管周囲

の腫瘍細胞上に濃縮し、それにより、腫瘍血管の凝固の引金となり、二重特異性結合リガンドに有意な有用性を与えると考えられる。

【0023】従って、第1結合領域は、腫瘍細胞に結合する抗体または他の薬剤のような成分であり得る。「腫瘍細胞に結合する」薬剤は、本明細書中で任意の接近可能な成分または腫瘍細胞の成分に結合するリガンドとして、あるいは本明細書にさらに記載されるように、それ自身が腫瘍細胞に結合するかまたは腫瘍細胞と関連する成分に結合するリガンドとして定義される。

【0024】このような腫瘍結合リガンドの大多数は、細胞表面腫瘍抗原またはマーカーに結合する薬剤、特に抗体であることが意図される。このような抗原の多くは、抗原結合および腫瘍標的化における使用のための種々の抗体が存在するように、公知である。従って、本発明は、表Iに例示されるような同定された腫瘍細胞表面抗原に結合する第1結合領域（例えば、抗体の抗原結合領域）、および表IIに例示される腫瘍細胞への結合のようなインタクトの腫瘍細胞に優先的にまたは特異的に結合する第1結合領域を含む。

【0025】現在、腫瘍細胞結合領域の好ましい例は、細胞表面腫瘍抗原p185^{HER2}、乳汁ムチンコアタンパク質（milk mucin core protein）、TAG-72、ルイスaまたはガン胎児性抗原（CEA）に結合する抗体の抗原結合領域を含む領域である。現在好ましい腫瘍細胞結合領域の別のグループは、抗体9.2.27、OV-TL3、MOv18、B3、KS1/4、260F9またはD612に結合する、腫瘍関連抗原に結合する抗体の抗原結合性領域を包含する領域である。

【0026】抗体9.2.27は高分子量（Mr）のメラノーマ抗原に結合し、OV-TL3およびMOv18の両方は卵巣関連の抗原に結合し、B3およびKS1/4はガン腫抗原に結合し、260F9は乳房ガン腫に結合し、そしてD612は結腸直腸ガン腫に結合する。D612、B3またはKS1/4と同じ抗原に結合する抗原結合部分が特に好ましい。D612は米国特許第5,183,756号に記載されており、ATCC受託番号HB9796を有し；B3は米国特許第5,242,813号に記載されており、ATCC受託番号HB10573を有し；そして組換えおよびキメラKS1/4抗体は米国特許第4,975,369号に記載されており；それぞれは参考として本明細書中に援用される。

【0027】腫瘍細胞標的化において、腫瘍マーカーが、生物学的リガンドが同定されている成分（例えば、レセプター）である場合、抗体よりもむしろこのリガンド自体がまた標的化剤として利用され得る。このようなリガンドの活性フラグメントまたは結合領域もまた利用され得る。

【0028】本発明における使用のための第1結合領域

はまた、腫瘍細胞マーカーと関連するリガンドに結合する成分であり得る。例えば、目的の腫瘍抗原が細胞表面レセプターである場合、インビボの腫瘍細胞は、それらの表面に結合しそして標的として利用可能な、対応する生物学的リガンド（例えば、ホルモン、サイトカインまたは増殖因子）を有する。これは、腫瘍細胞によって生成され、続いてこの細胞の表面に結合され得る循環性リガンドおよび「パラ分泌型」リガンドの両方を含む。

【0029】従って、本発明はさらに、同定された腫瘍細胞表面抗原（表Iに例示されるような）に結合するリガンドに結合するか、あるいは1つまたはそれ以上のインタクトの腫瘍細胞に優先的にまたは特異的に結合する第1結合領域（例えば、抗体およびそのフラグメント）を包含する。さらに、レセプター自体、または好ましくはレセプターまたはレセプター結合ドメインの操作された形態または可溶性形態もまた二重特異性凝固リガンドの結合領域として利用され得る。

【0030】さらなる実施態様では、第1結合領域は、腫瘍部位以外の疾患部位で特異的または優先的に発現される標的分子に結合する成分であり得る。他の疾患細胞と関連する代表的な標的分子は、例えば、良性前立腺肥大症（BPH）と関連するPSAおよび増殖性糖尿病性網膜症と関連するFGFを含む。上記の疾患の1つを有する動物または患者は、疾患部位における凝固の特異的誘発から恩恵を受け得ると考えられる。

【0031】本明細書の文脈中では「疾患細胞」の意味は、疾患または障害と関連した細胞である。この細胞は、非疾患の部位および細胞中のレベルに比べて、疾患の部位および細胞中でより高い濃度で存在する標的可能な成分を発現するかまたはそれと関連する。これは、疾患部位中の血管系と関連する標的可能な成分を含む。

【0032】他の疾患部位にコアギュラントを標的づけかつ送達する使用のための代表的な第1結合領域は、抗体（例えば、抗-PSA（BPH）、およびFGFに結合するGF82、GF67-3H3）を含む。対応するレセプター（この場合はFGFレセプター）に結合する生物学的結合リガンド（例えば、FGF）もまた使用され得る。以下に記載されるように、血管標的に対する抗体もまた使用され得る。支質または内皮細胞の標的化は、他の疾患を処置する強力な手段を提供し、ここで「疾患細胞」自体は強力または独特なマーカー抗原と関連しなくても良い。

【0033】さらなる実施態様では、本発明の第1結合領域は、疾患関連の血管系、すなわち、特異的凝固が動物または患者に有利であり得る血管系の領域の成分に結合し得る成分である。腫瘍血管系と特異的または優先的に関連する成分に結合し得る第1結合領域が、現時点では好ましい。「腫瘍血管系の成分」は、腫瘍血管系内皮細胞表面分子および細胞表面レセプターまたは分子に結合し得る任意の成分（例えば増殖因子）の両方を含む。

【0034】特定の好ましい結合リガンドは、細胞表面レセプターに結合する抗体およびそのフラグメント、ならびにこれらのレセプターの対応する生物学的リガンドに結合する抗体である。代表的な抗体は、MHCクラスIIタンパク質、VEGF/VPEレセプター、FGFレセプター、TGFβレセプター、TIE（TIE-1およびTIE-2を含む、チロシンキナーゼ免疫グロブリン-上皮増殖因子様レセプター）、VCAM-1、P-セレクトリン、E-セレクトリン、α_vβ₃インテグリン、プレイオトロピン（pleiotropin）、エンドシアリン（endosialin）およびエンドグリン（endoglin）に結合する抗体である。

【0035】エンドグリンに結合する抗体の抗原結合領域を含む第1結合領域は、好ましい薬剤の1群である。これらは、モノクローナル抗体TEC-4またはモノクローナル抗体TEC-11と同じエピトープに結合する抗体およびフラグメントにより代表される。

【0036】VEGFレセプターに結合する抗体の抗原結合領域は、好ましい薬剤の別の群である。これらは、特に、モノクローナル抗体3E11、3E7、5G6、4D8、10B10またはTEC-110と同じエピトープに結合する抗体またはフラグメントにより代表される。以下のように名付けた抗体の任意の1つと実質的に同じ結合特異性を有する抗-VEGF抗体もまた使用され得る：1B4、4B7、1B8、2C9、7D9、12D2、12D7、12E10、5E5、8E5、5E11、7E11、3F5、10F3、1F4、2F8、2F9、2F10、1G6、1G11、3G9、9G11、10G9、GV97、GV39、GV97 γ 、GV39 γ 、GV59またはGV14。さらに適切な抗VEGF抗体は、4.6.1.、A3.13.1、A4.3.1およびB2.6.2（Kimら、1992）；SBS94.1（Oncogene Science）；G143-264およびG143-856（Pharmingen）を含む。

【0037】さらに有用な抗体は、腫瘍血管系細胞表面レセプターに結合するリガンドに結合する抗体である。従って、VEGF/VPF、FGF、TGFβに結合する抗体、TIEに結合するリガンド、腫瘍関連のイソ型フィブロンネクチン、スキャッター因子（scatter factor）、肝細胞増殖因子（HGF）、血小板因子4（PF4）、PDGF（PDGF α およびPDGF β を含む）およびTIMP（メタロプロテイナーゼの組織インヒビター、TIMP-1、TIMP-2およびTIMP-3を含む）は、これらの実施態様で有用であり、そのうち、VEGF/VPF、FGF、TGFβに結合する抗体、TIEに結合するリガンドまたは腫瘍関連イソ型フィブロンネクチンがしばしば好ましい。

【0038】さらに別の実施態様では、腫瘍血管系に特異的なマーカーは、最初に誘導された、すなわち、それ

の発現が人間の手によって特異的に操作されたマーカーであり得、それにより、結合リガンド（例えば、抗体）を用いる次の標的化を可能にする。

【0039】代表的な誘導性抗原は、単核細胞、マクロファージ、肥満細胞、ヘルパーT細胞、CD8-陽性T細胞、NK細胞または腫瘍細胞によってさえ放出され得るような、サイトカイン（例えば、IL-1、IL-4、TNF- α 、TNF- β またはIFN- γ ）により誘導性抗原を含む。誘導された標的の例は、E-セレクトリン、VCAM-1、ICAM-1、エンドグリンおよびMHCクラスII抗原である。MHCクラスII誘導を使用する場合、正常組織中のMHCクラスIIの抑制が、シクロスポリン（例えば、シクロスポリンA（CsA）、または機能的に等価な薬剤）を用いて達成され得るように、一般に必要とされる。

【0040】さらに誘導性抗原は、コアギュラント（例えば、トロンビン、第IX/Xa因子、第X/Xa因子、プラスミンまたはメタロプロテイナーゼ（マトリックスメタロプロテイナーゼ、MMP））によって誘導性抗原を含む。一般に、トロンビンによって誘導性抗原が使用される。この群の抗原は、P-セレクトリン、E-セレクトリン、PDGFおよびICAM-1を含み、そのうち、P-セレクトリンおよび/またはE-セレクトリンの誘導および標的化が一般に好ましい。

【0041】リガンド-レセプター複合体（complex）に存在するが、個々のリガンドおよびレセプターの両方には存在しないエピトープに結合する抗体もまた使用され得る。このような抗体は、細胞表面に存在するリガンド-レセプター複合体を認識し、かつそれに結合するが、遊離のリガンドまたは複合体化されていないレセプターには結合しない。従って、本明細書中で使用される「リガンド-レセプター複合体」は、リガンド（例えば、増殖因子）がそのレセプター（例えば、増殖因子レセプター）に特異的に結合する場合に生成される結果としての複合体を意味する。これは、VEGF/VEGFレセプター複合体により代表される。

【0042】このようなりガンド-レセプター複合体は、腫瘍に関連しない内皮細胞よりも腫瘍関連の内皮細胞上で有意に多い数で存在するようであり、それゆえ、抗複合体抗体により標的化され得ることが期待される。抗複合体抗体は、モノクローナル抗体2E5、3E5または4E5と同じエピトープに結合するような抗体およびそのフラグメントを含む。

【0043】さらなる実施態様では、本発明における使用のために意図される第1結合領域は、疾患関連の支質の成分（例えば、腫瘍関連の支質の成分）に結合する。これは、基底膜成分、活性された血小板および誘導性の腫瘍支質成分、特にコアギュラント（例えば、トロンビン）によって誘導性の成分に結合する抗体の抗原結合領域を含む。「活性化された血小板」は、本明細書では腫

瘍支質の成分として定義され、その理由の1つは、それらが活性されるときに支質に結合することである。

【0044】腫瘍関連支質の好ましい標的可能な要素は、現在のところ、腫瘍関連イソ型フィブロネクチンである。イソ型フィブロネクチンは、インテグリンファミリーのレセプターに結合するリガンドである。腫瘍関連のイソ型フィブロネクチンは、例えば、MAb BC-1によって認識されるように利用可能である。従って、このMAb、および類似の特異性を有する他のMAbは、本発明における使用のために好ましい薬剤である。イソ型フィブロネクチンは、支質成分であるが、内皮細胞に結合し、それゆえ、本発明の文脈では標的可能な血管内皮細胞結合リガンドとして考慮され得る。

【0045】好ましい抗支質抗体の別の群は、フィブリノーゲン上のRIBS（レセプター誘導結合部位）に結合する抗体である。RIBSは、標的可能な抗原であり、支質におけるRIBSの発現は活性化された血小板によって指示される。活性化された血小板上のリガンド誘導結合部位であるLIBSに結合する抗体もまた有用である。

【0046】有用な抗体のさらなる群の1つは、種々の良性および悪性の腫瘍の支質で発現される高分子量の細胞外糖タンパク質であるテネイシンに結合する抗体である。それゆえ、Shresthaら（1994）に記載されるような抗体およびTuominen & Kallioinen（1994）により記載される143DB7C8は、コアギュリガンド（coaguligand）の結合部分として使用され得る。

【0047】「疾患および腫瘍関連の支質の成分」は、種々の細胞型、マトリックス成分、エフェクター、およびそのいくつかが「支質」の最も狭い定義から外れると考えられ得る他の分子成分を含むが、疾患領域（例えば、腫瘍）と優先的に関連する標的可能な実体である。

【0048】従って、第1結合領域は、平滑筋細胞、周囲細胞（pericyte）、繊維芽細胞、マクロファージ、浸潤性リンパ球または白血球に結合する抗体またはリガンドであり得る。第1結合領域はまた、結合組織の成分に結合し得、そして例えば、フィブリン、プロテオグリカン、糖タンパク質、コラーゲン、およびアニオン性ポリサッカライド（例えば、ヘパリンおよびヘパリン様化合物）に結合する抗体およびリガンドを含む。

【0049】他の好ましい実施態様では、本発明の血管系および支質結合リガンドは、それら自体が抗体であるよりもむしろ生物学的なりガンドまたはその一部分である結合領域である。この意味では、「生物学的なりガンド」は、サイトカイン、ホルモン、増殖因子などにより代表されるように、細胞表面分子（例えば、レセプター）に結合するかまたはこれと会合し、支質中または血管細胞上に接近可能な分子である。任意のそのような増殖因子またはリガンドが、それが疾患関連の支質または

血管系、例えば、腫瘍血管系内皮細胞の表面上に存在する特異的生物学的レセプターに結合する限り、使用され得る。

【0050】本発明のこれらの局面における使用のための適切な増殖因子は、例えば、VEGF/VPF（血管内皮増殖因子/血管透過性因子）、FGF（タンパク質の繊維芽細胞増殖因子ファミリー）、TGF β （形質転換増殖因子B）、TIEに結合するリガンド、腫瘍関連のイソ型フィブロネクチン、スキャッター因子（scatter factor）、肝細胞増殖因子（HGF）、血小板因子4（PF4）、PDGF（血小板由来の増殖因子）、TIMPまたはIL-8、IL-6またはXIIIa因子さえを含む。VEGF/VPFおよびFGFがしばしば好ましい。

【0051】公知のレセプターに基づいた結合リガンド構築物を用いて内皮細胞結合成分（例えば、サイトカインまたは増殖因子）を標的にすることもまた意図される。一般に、レセプターが標的化成分として使用される場合、レセプターの短縮型または可溶性形態が利用され得る。このような実施態様では、標的化された内皮細胞結合成分が二量体リガンド（例えば、VEGF）であることが特に好ましい。これが好ましい理由は、二量体の1つ成分が既に細胞表面レセプターにインサイチュで結合され、二量体の他の成分を二重特異性の凝固リガンドの可溶性レセプター部分に結合するために利用されるように残すからである。

【0052】疾患関連の血管系の成分に結合し得る少なくとも1つの標的化領域を含む二重特異性、あるいは三重または多重特異性リガンドは、血管内皮細胞、および疾患関連の薬剤（例えば、活性化された血小板）が、異なる疾患において（特に異なる腫瘍において）類似しているという利点を有する。この現象は、個々の疾患または特異的な腫瘍タイプのそれぞれに薬剤を合わせなければならぬよりも、多くの疾患およびガンのタイプを1種の薬品で処置することを実行可能にする。

【0053】それゆえ、本発明の組成物および方法は、血管成分を有する良性および悪性疾患を処置するための使用に適切である。このような血管系関連疾患は、良性増殖（例えば、BPH）、糖尿病性網膜症、血管再狭窄、動静脈性奇形（AVM）、髄膜腫、血管腫、血管新生緑内障および乾癬を含む。さらにこの群に含まれるのは、滑膜炎、皮膚炎、子宮内膜炎、血管繊維腫、慢性関節リウマチ、アテロマ硬化斑、角膜移植新血管化、血友病性関節、過形成性癭痕、osler-weber症候群、化膿性肉芽腫、水晶体後繊維増殖、硬皮症、トラコーマおよび血管癒着である。上記疾患のそれぞれは、共通の血管依存性病理学を有することが知られ、それゆえ、これは、疾患部位において凝固を達成することが有益であり得ることが意図される。

【0054】本発明の二重特異性結合リガンドー凝固因

子接合体は、例えば、生化学的架橋剤、および好ましくは、SMP Tにより代表されるように、血中においてかなりの安定性を有するものを使用することにより、2つまたはそれ以上成分が共有結合される接合体であり得る。これらの成分はまた、周知のアビジン（またはストレプトアビジン）およびビオチンの組み合わせを使用して連結され得る。種々の架橋剤、アビジン：ビオチン組成物および組み合わせ、ならびに接合体を調製する技術は、当該分野で周知であり、そして本明細書にさらに記載される。

【0055】あるいは、このような二重特異性凝固剤は、分子生物学的技術、即ち、結合リガンドまたは領域をコードする遺伝子（またはcDNA）を凝固因子をコードする遺伝子（またはcDNA）に連結することにより調製される融合タンパク質であり得る。このことは当該技術分野で周知であり、そして本明細書でさらに記載される。代表的には、凝固因子をコードするDNAセグメントに作動可能に連結された第1の結合領域をコードするDNAセグメントを同じリーディングフレームで含む発現ベクターが調製され、そして組換え宿主細胞がコードされた融合タンパク質を産生するようにこのベクターを発現する。

【0056】本発明で使用するための凝固因子は、第II/IIa因子、第VII/VIIa因子、第IX/IXa因子または第X/Xa因子のような、ビタミンK依存性凝固因子の1つを含み得る。第V/Va因子、第VIII/VIIIa因子、第XI/XIa因子、第XII/XIIa因子および第XIII/XIIIa因子もまた用いられ得る。

【0057】特定の局面は、Gla改変を欠くビタミンK依存性凝固因子に関する。このような因子は、ビタミンK依存性凝固因子をコードする遺伝子を、原核生物宿主細胞中（この細胞はGluからGlaへの変換を行うことができない）で発現することにより調製され得る。この因子はまた、必要なまたは「対応する」グルタミン酸残基を欠いているビタミンK依存性凝固因子をコードする遺伝子操作された凝固因子遺伝子を作成し、次いで、この遺伝子操作された遺伝子を、実際に、任意の組換え宿主細胞で発現することにより調製され得る。同様に、このような凝固因子はまた、ビタミンK依存性凝固因子タンパク質を処理して対応するグルタミン酸残基を除去または改変することにより調製され得る。

【0058】本発明の結合リガンドに使用される好ましい凝固因子は、組織因子および組織因子誘導体である。有用な組織因子の1つのグループは、第VII因子を活性化する能力を欠く変異体である。組織因子は、一般にアミノ酸配列の約157位と約167位との間の領域に由来する1つまたはそれ以上のアミノ酸を改変することにより第VII因子を活性化する能力における欠損を与え得る。例示の変異体は、158位のTrpがArg

に；162位のSerがAlaに；164位のGlyがAlaに変化した変異体；ならびに158位のTrpがArgに、かつ162位のSerがAlaに変化した二重変異体である。

【0059】さらに好ましい組織因子誘導体は、短縮型組織因子、二量体またはなお多量体の組織因子、および二量体またはなお多量体の短縮型組織因子である。

【0060】本発明は、少なくとも1つの他の組織因子または誘導体に作動可能に連結された組織因子または誘導体を含む新規な組織因子構築物をさらに提供する。短縮型組織因子が好ましく、短縮型の組織因子が改変されて疎水性膜挿入部分を含む場合が特に好ましい。

【0061】本明細書で規定されるように「疎水性膜挿入部分」は、組織因子の膜への挿入または膜との機能的接触を指向する1つまたはそれ以上のユニットである。本発明の疎水性膜挿入部分は、約3と約20との間の疎水性アミノ酸のような実質的に疎水性のアミノ酸の連続部分により；および脂肪酸によっても例示される。

【0062】疎水性アミノ酸は、短縮型組織因子のN末端もしくはC末端に配置され得るか、または分子の別の点に付加され得るかのいずれかである。疎水性アミノ酸が用いられる場合、これらは、有利には、分子生物学的技術により分子中に組み込まれ得る。同様に、疎水性アミノ酸または脂肪酸は、合成化学技術を用いて組織因子に付加され得る。

【0063】本発明の組織因子二量体、三量体および多量体では、組織因子または誘導体の各々は、例えば、ジスルフィド、チオエーテルまたはペプチド結合を介して作動可能に連結され得る。ある実施態様では、組織因子ユニットは、その使用が意図される血漿中、または生理学的環境中で実質的に安定である結合を介して連結される。これは、組織因子の二量体形態が生物学的に最も活性であることが証明され得るという本発明者らの思想に基づく。しかし、本発明の方法では、組織因子単量体が活性であることが知られているように、安定な結合が必要な訳ではない。

【0064】二量体および多量体中の1つまたはそれ以上の組織因子または短縮型組織因子はまた、改変されて、結合領域のような第2の薬剤に組織因子構築物を連結するために適切である末端システイン残基または別の部分を含み得る。

【0065】従って、選択的に切断可能なアミノ酸配列を含むペプチドを含む、組織因子単量体、短縮型組織因子、および組織因子二量体ならびに多量体は、本発明の別の局面を形成する。ウロキナーゼ、プラスミン、トロンビン、第IXa因子、第Xa因子、または間質コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ (gelatinase)、またはストロメリシン (stromelysin) のようなメタロプロテイナーゼに対する切断部位を含むペプチドリンカーが特に好ましい。

【0066】従って、組織因子単量体、短縮型組織因子、組織因子二量体および多量体、ならびに実際任意のコアギュラントを、生物学的に放出可能な結合を介して、抗体、抗体の抗原結合領域、リガンド、またはレセプターのような第2の薬剤に連結し得る。上記の列举したプロテイナーゼに対する切断部位を含むペプチドリンカーの選択は、例えば、腫瘍環境内のそのようなプロテイナーゼの存在に基づく。腫瘍部位に対する二重特異性薬剤またはリガンドの送達は、切断を生じると予想され、凝固因子の相対的に特異的な放出を生じる。

【0067】本発明の特定の構築物は、その配列中に作動可能に連結した一連の以下のユニットを含む構築物である：システイン残基、選択的に切断可能なペプチドリンカー、疎水性アミノ酸の連続部分、第1の短縮型組織因子、および第2の短縮型組織因子；または配列中に：第1のシステイン残基、選択的に切断可能なペプチドリンカー、疎水性アミノ酸の第1の連続部分、第1の短縮型組織因子、第2の短縮型組織因子、および疎水性アミノ酸の第2の連続部分；ここで各構築物は、抗体、リガンドまたはレセプターのような第2の薬剤に連結されてもよく、または連結されなくてもよい。

【0068】他の適切な凝固因子は、ラッセルクサリヘビ蛇毒X因子アクチベーター；トロンボキサン₂ およびトロンボキサン₂ シンターゼのような血小板活性化化合物；および α 2-抗プラスミンのようなフィブリン溶解のインヒビターである。

【0069】凝固因子が複合体に共有結合しないが、構築物の標的化に作動可能に連結している第2の結合領域への結合手段により非共有結合する結合リガンドもまた、本発明に包含される。適切な「第2の結合領域」は、凝固因子に対して結合特異性を有する抗体の抗原結合部位を含み、これには、ScFv、Fv、Fab'、FabおよびF(ab')₂ フラグメントのような、抗体の機能的部分が含まれる。

【0070】従って、ビタミンK依存性凝固第II/IIa因子、第VII/VIIa因子、第IX/IXa因子、または第X/Xa因子；Gla改変を欠くビタミンK依存性凝固因子；組織因子、変異体組織因子、短縮型組織因子、二量体組織因子、多量体組織因子、二量体短縮型組織因子；プレカリクレイン；第V/Va因子、第VIII/VIIIa因子、第XI/XIa因子、第XII/XIIa因子、および第XIII/XIIIa因子；ラッセルクサリヘビ蛇毒X因子アクチベーター、トロンボキサン₂ または α 2-抗プラスミンに対して指向された抗体、またはそれらのフラグメントを含む結合リガンドが考慮される。

【0071】非共有結合した凝固剤は、凝固因子に結合され得るか、または凝固因子と「予め複合体化」され得、それらを用いて、投与の際に、外因性凝固因子を動物の疾患部位（例えば腫瘍血管系）に送達し得る。同様

に、凝固因子に特異的な第2の結合領域を含む結合リガンドもまた、「非複合体化」形態および特異的凝固をなお達成する機能で動物に投与され得る；この例では、薬剤は、循環（内因性）凝固因子を蓄積し得、そしてそれを疾患部位または腫瘍部位内に濃縮する。

【0072】用語「凝固因子」または凝固剤は、内因性凝固因子およびその誘導体、または組換え型を含む外から添加された型のこのような因子であり得る。コアギュラント（本発明の「コアギュリガンド（coagulating and）」）は、トキシシン（イムノトキシシン）に対して明確な利点を有する。何故なら、これらは、100%疾患に限定されないことがわかるマーカーを標的にする際、顕著な有害な副作用を生じないからである。さらに、用いられるコアギュラントは、ほとんどの場合ヒト起源であり、そしてそれ故、リシンA鎖のような外来トキシシンより免疫原性の問題が少ないからである。

【0073】このような組成物に制限されないが、本発明に従った組成物の重要な例は、二重特異性抗体であり、この抗体は、疾患細胞または疾患関連血管系マーカーの成分に結合する第1の抗原結合領域、および凝固因子に結合する第2の抗原結合領域を含む。本発明はまた、このような二重特異性抗体のscFv、Fv、Fab'、Fab、およびF(ab')₂断片を提供する。このような二重特異性抗体の1つの現在好ましい例は、MHCクラスII抗原に対して指向される1つの結合部位、および組織因子に対して指向される別の結合部位を含む抗体である。

【0074】さらなる実施態様で、本発明は、上記の結合リガンドおよび二重特異性抗体の任意または組み合わせを薬理的に受容可能な形態で含む薬学的組成物、および治療用キットを提供する。これは、結合リガンドが、凝固因子に共有結合している第1の結合領域を有し、そしてまた結合リガンドにおける第1の結合領域は、次に凝固因子に結合する第2の結合領域に共有結合する一結合は動物への投与の前、または投与後に起こる一薬学的組成物およびキットを含む。

【0075】本発明に従って、二重特異性、三重特異性、または多重特異性の結合リガンドの組み合わせを含む薬学的組成物および治療用キットがまた考慮される。これは、1つの結合リガンドが疾患細胞または腫瘍細胞に指向し、そしてもう1つが血管系内皮細胞マーカーまたは疾患関連支質の成分に対して指向する組み合わせを含む。抗体、イムノトキシシン、免疫エフェクター、化学療法剤などのような他の別の成分もまた、本発明の組成物およびキットに含まれ得る。

【0076】キットはまた、正常組織の内皮細胞で抗原発現を抑制する際の使用については、シクロスポリンのような抗原サプレッサー；および／または疾患関連血管内皮細胞または支質を誘導して標的化可能な抗原を発現する際の使用については、E-セレクトリン、P-セレクト

リン、またはMHCクラスII抗原のような「誘導剤」を含み得る。例示の誘導剤は、疾患または腫瘍抗原を結合し、そしてIFN- γ を生成するT細胞クローンを含むが、このようなクローンは、キットを用いて処置されるべき動物から単離されることが現在好ましい。

【0077】好ましい誘導剤は、疾患または腫瘍細胞抗原、あるいは支質成分にさえも結合し、そして所望の標的抗原の発現を誘導するサイトカイン、コアギュラント、または他の因子を産生し得るエフェクター細胞に結合する二重特異性抗体である。現在のところ、二重特異性抗体の1つの好ましい群は、腫瘍抗原に、および活性化抗原CD14またはCD16に結合して、単球、マクロファージ、またはマスト細胞によるIL-1産生を刺激するような群；ならびに腫瘍抗原に、および活性化抗原CD2、CD3またはCD28に、そして好ましくはCD28に結合して、NK細胞によりまたは好ましくはT細胞によりIFN- γ 産生を刺激するような群である。

【0078】二重特異性抗体の第2番目の好ましい群は、腫瘍抗原にまたは腫瘍支質の成分に、および組織因子、組織因子誘導体、プロトロンビン、第VII/VIIa因子、第IX/IXa因子、第X/Xa因子、第XI/XIa因子、またはラッセルクサリヘビ蛇毒X因子アクチベーターに結合して、トロンビン産生を刺激するような群である。このような二重特異性抗体を第1の「誘導」組成物として含むキットは、一般に、P-セレクトリンまたはE-セレクトリンに結合する第1の結合領域を含む結合リガンドを含む第2の薬学的組成物を含む。

【0079】本発明の二重特異性リガンド、および所望による他の成分は、1つまたはそれ以上の適切な容器手段を用いて、便利なように少量に分けおよびパッケージにされ、そして別々の容器は単一のパッケージで調剤され得る。薬学的組成物およびキットは、本明細書にさらに記載されている。

【0080】本発明は、コアギュラントの送達および疾患処置において有意な臨床的有用性を有しているが、それはまた多くのインビトロ用途を有する。これらは例えば、二重特異性化合物である、特定の抗体、リガンド、またはレセプターの結合能力に基づく種々のアッセイを含む。従って、本発明の二重特異性凝固リガンドは、本明細書にさらに記載されるように、イムノブロット、ウェスタンブロット、ドットブロット、RIA、ELISA、免疫組織化学、蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）、免疫沈降、アフィニティクロマトグラフィーなどのような、標準的な結合アッセイおよびプロトコールで用いられ得る。

【0081】なおさらなる実施態様では、本発明は、糖尿病性網膜症、血管再狭窄、AVM、血管腫、血管新生緑内障、乾癬および慢性関節リウマチ、ならびに血管化腫瘍成分を有する腫瘍のような疾患を処置するために用

いられ得るように、疾患関連血管系にコアギュラントを送達する方法に関する。このような方法は一般に、血管成分を有する疾患を伴うヒト被験体を含む動物に、少なくとも1つの上記のような二重特異性結合リガンドを含む薬学的組成物を投与する工程を包含する。

【0082】組成物は、疾患部位（例えば固形腫瘍）の血管系で血液凝固を促進するに有効な量および経路により投与される。有効用量は、好適な実施態様および詳細な実施例中の情報のような、本発明の開示を考慮すれば、当業者に公知である。他の方法のように、例えば、血管化腫瘍部位への注射のような非経口投与がしばしば適切である。

【0083】本発明の方法は、共有結合した凝固因子を含む結合リガンドを投与する手段、および二重特異性リガンドまたは抗体の第2の結合領域に複合体化されている非共有結合した凝固因子を含む結合リガンドを投与する手段の両方により、外因性凝固因子の送達を提供する。

【0084】本発明のさらなる方法は、疾患または腫瘍血管系への内因性凝固因子の送達を生じる方法を含む。これは、動物または患者に、内因性凝固因子に結合しそしてこの因子を疾患関連または腫瘍血管系に濃縮する第2の結合領域を含む結合リガンドを投与することにより達成される。

【0085】なおさらなる方法論の実施態様では、腫瘍血管系または支質のマーカーが特異的に誘導され、次いで抗体のような結合リガンドを用いて標的とされ得ることが考慮される。例示の誘導性抗原は、E-セレクトイン、P-セレクトイン、MHCクラスII抗原、VCAM-1、ICAM-1、エンドグリン、LAM-1と反応性のリガンド、血管アドレシン（addressin）、および他の接着分子を含み、E-セレクトインおよびMHCクラスII抗原が現在好適である。

【0086】誘導しそして次にMHCクラスIIタンパク質を標的にする場合、正常組織中のMHCクラスIIの抑制が一般に必要である。MHCクラスII抑制は、シクロスポリン、または機能的に等価な薬剤を用いて達成され得る。次いでMHCクラスII分子は、疾患関連血管系をエフェクター細胞（一般に誘導性サイトカインIFN- γ を放出する、動物のヘルパーT細胞またはNK細胞）に曝すことなどによる、シクロスポリンに依存しない手段を用いて疾患関連血管内皮細胞中で誘導され得る。

【0087】活性化された単球、マクロファージ、およびさらにマスト細胞は、E-セレクトインを誘導するサイトカイン（IL-1；TNF- α ；TNF- β ）を生成し得るエフェクター細胞である；その一方、ヘルパーT細胞、CD-8陽性T細胞およびNK細胞は、MHCクラスIIを誘導するIFN- γ を生成し得る。IL-1を生成するために疾患部位で単球／マクロファージを

活性化すること、またはIFN- γ を生成するために疾患関連ヘルパーT細胞またはNK細胞を活性化することは、動物に、エフェクター細胞表面活性化抗原に結合する活性化抗体を投与することにより達成され得る。例示の活性化抗原は、単球／マクロファージについてはCD14およびCD16（IgEについてはFcR）；およびT細胞についてはCD2、CD3およびCD28；を含み、特定の実施態様で使用するためには、CD14およびCD28がそれぞれ好適である。

【0088】特異的な活性化および誘導を達成するために、1つの現在好ましい方法は、CD14またはCD28のようなエフェクター細胞活性化抗原、および疾患または腫瘍細胞抗原の両方に結合する二重特異性抗体を用いることである。これらの二重特異性抗体は、疾患または腫瘍部位に局在化し、そして単球／マクロファージおよびT細胞をそれぞれ活性化する。標的疾患または腫瘍成分付近の活性化されたエフェクター細胞は、誘導性サイトカイン、この場合、IL-1およびIFN- γ をそれぞれ生成する。

【0089】正常組織中のMHCクラスII抑制はまた、動物に抗CD-4抗体を投与することにより達成され得る；動物のT細胞によるIFN- γ 産生を抑制するこの機能は、MHCクラスII発現の阻害を生じる。MHCクラスII分子は、再び、疾患部位をIFN- γ のみに曝すことにより疾患関連血管内皮細胞で特異的に誘導され得る。これを達成するための1つの手段は、疾患部位にある抗原に結合するIFN- γ 産生T細胞クローンを動物投与することによる。このIFN- γ 産生T細胞は、好ましくは、インビトロで増殖した腫瘍浸潤性白血球（TIL）のような、動物の疾患部位から得られる浸潤性白血球である。

【0090】二重特異性抗体を用いて、トロンビンのようなコアギュラント産生を、腫瘍部位のような局所環境でのみ誘導する方法がまた提供される。さらに、これは、一般に、腫瘍細胞または腫瘍支質の成分、および組織因子、組織因子誘導體、プロトロンビン、第VII/VIIa因子、第IX/IXa因子、第X/Xa因子、第XI/XIa因子、またはラッセルクサリヘビ蛇毒X因子アクチベーターに結合する二重特異性抗体を含む薬学的組成物を動物に投与することにより達成され得る。次いで、E-セレクトインまたはP-セレクトインに結合する抗体が、凝固因子または凝固因子に結合する第2の結合領域に連結し、そして動物の血流中に導入される。

【0091】より一般的な組み合わせ処理療法もまた可能であり、ここでは、例えば、本発明の腫瘍凝固エレメントを、放射線療法または化学療法のような現存する抗腫瘍療法と組み合わせるか、または抗腫瘍イムノトキシンのような第2の免疫学的試薬の使用と組み合わせる。良性疾患の新規の処置方法もまた、現在用いられている他の療法と組み合わせられ得る。

【0092】従って、1つの局面において、本発明は、以下の(a)および(b)を含む結合リガンドを提供する：

(a) 疾患細胞、疾患関連血管系の成分、または疾患関連支質の成分に結合する第1結合領域；この第1結合領域が作動可能に連結した

(b) 凝固因子、または凝固因子に結合する第2結合領域。

【0093】1つの実施形態において、上記第1結合領域は、IgG抗体、IgM抗体、または抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0094】別の実施形態において、上記第1結合領域は、抗体のscFv、Fv、Fab'、FabまたはF(ab')₂フラグメントを含み得る。

【0095】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、腫瘍細胞、腫瘍血管系の成分、または腫瘍支質の成分に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0096】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、腫瘍細胞の細胞表面抗原に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0097】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、細胞表面腫瘍抗原p185^{HER2}、乳汁ムチンコアタンパク質、TAG-72、ルイスa、ガン胎児性抗原(CEA)、または腫瘍関連抗原に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得、この腫瘍関連抗原は、9.2.27、OV-TL3、MOV18、B3、KS1/4、260F9およびD612からなる群から選択される抗体に結合し得る。

【0098】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、腫瘍血管系の成分に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0099】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、腫瘍血管系細胞表面レセプターに結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0100】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、MHCクラスIIタンパク質、VEGF/VPFレセプター、FGFレセプター、TGFβレセプター、TIE、VCAM-1、P-セレクチン、E-セレクチン、α_vβ₃インテグリン、プレイオトロピン、エンドシアリンまたはエンドグリンに結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0101】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、エンドグリンに結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0102】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、モノクローナル抗体TEC-4またはモノクローナル抗体TEC-11と同じエピトープに結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0103】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、VEGFレセプターに結合する抗体の抗原結合

性領域を含み得る。

【0104】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、モノクローナル抗体3E11、3E7、5G6、4D8または10B10と同じエピトープに結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0105】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、モノクローナル抗体TEC-110と同じエピトープに結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0106】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、腫瘍血管系細胞表面レセプターに結合するリガンドに結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0107】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、VEGF/VPF、FGF、TGFβ、TIEに結合するリガンド、腫瘍関連フィブロネクチンイソ型、スキッターファクター、肝細胞増殖因子(HGF)、血小板第4因子(PF4)、PDGFまたはTIMPに結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0108】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、VEGF/VPF、FGF、TGFβ、TIEに結合するリガンドまたは腫瘍関連フィブロネクチンイソ型に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0109】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、誘導性の腫瘍血管系成分に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0110】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、コアギュラントにより誘導性の腫瘍血管系成分に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0111】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、トロンビンにより誘導性の腫瘍血管系成分に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0112】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、P-セレクチンまたはE-セレクチンに結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0113】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、サイトカインによって誘導性の腫瘍血管系成分に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0114】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、単球、マクロファージ、マスト細胞、ヘルパーT細胞、CD8-陽性T細胞またはNK細胞が放出するサイトカインによって誘導性の腫瘍血管系成分に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0115】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、サイトカインIL-1、IL-4、TNF-α、TNF-βまたはIFN-γによって誘導性の腫瘍血管系成分に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0116】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、E-セレクチン、VCAM-1、ICAM-1、エンドグリンまたはMHCクラスII抗原に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0117】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、E-セレクトリンに結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0118】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、MHCクラスII抗原に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0119】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、リガンド：レセプター複合体に結合する抗体であり得るが、このリガンドまたはレセプターがリガンド：レセプター複合体になっていない場合には、このリガンドまたはこの因子レセプターに結合しない抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0120】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、モノクローナル抗体2E5、3E5または4E5と同じエピトープに結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0121】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、腫瘍支質の成分に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0122】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、テネシシンに結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0123】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、基底膜成分に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0124】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、活性化血小板に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0125】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、誘導性の腫瘍支質成分に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0126】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、コアグュラントによって誘導性の腫瘍支質成分に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0127】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、トロンビンによって誘導性の腫瘍支質成分に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0128】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、RIBSに結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0129】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、疾患細胞または疾患関連血管系の成分に結合するリガンドまたはレセプターを含み得る。

【0130】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、腫瘍細胞表面レセプターに結合するリガンド、または腫瘍細胞表面分子に結合するリガンドに結合するレセプターの可溶性結合ドメインを含み得る。

【0131】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、腫瘍血管系の成分に結合するリガンドまたはレセプターを含み得る。

【0132】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、腫瘍血管系内皮細胞表面レセプターに結合するリガンドを含み得る。

【0133】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、VEGF/VPF、FGF、TGF β 、TIEに結合するリガンド、腫瘍関連フィブロネクチンイソ型、スキャッターファクター、肝細胞増殖因子(HGF)、血小板第4因子(PF4)、PDGFまたはTIMPを含み得る。

【0134】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、VEGF/VPFを含み得る。

【0135】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、FGFを含み得る。

【0136】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、腫瘍血管系内皮細胞表面レセプターに結合するリガンドに結合するレセプターの可溶性結合ドメインを含み得る。

【0137】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、VEGF/VPFレセプターの可溶性結合ドメインを含み得る。

【0138】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、凝固因子に作動可能に連結し得る。

【0139】さらなる実施形態において、上記凝固因子は、ビタミンK依存性II/IIa凝固因子、VII/VIIa因子、IX/IXa因子またはX/Xa因子を含み得る。

【0140】さらなる実施形態において、上記凝固因子は、G1a改変を欠くビタミンK依存性凝固因子を含み得る。

【0141】さらなる実施形態において、上記凝固因子は、ビタミンK依存性凝固因子をコードする遺伝子を原核宿主中で発現させることによって調製され得る。

【0142】さらなる実施形態において、上記凝固因子は、ビタミンK依存性凝固因子タンパク質を処理して、その対応のグルタミン酸残基を除去または変更することによって調製され得る。

【0143】さらなる実施形態において、上記凝固因子は、その対応のグルタミン酸残基を欠くビタミンK依存性凝固因子をコードする操作された凝固因子遺伝子を調製すること、およびこの操作された遺伝子を組換え宿主細胞中で発現させることによって調製され得る。

【0144】さらなる実施形態において、上記凝固因子は、組織因子または組織因子誘導体を含み得る。

【0145】さらなる実施形態において、上記凝固因子は、VII因子を活性化する能力が欠損した変異組織因子を含み得る。

【0146】さらなる実施形態において、上記凝固因子は、約157位と約167位との間のアミノ酸領域における変異を伴う組織因子を含み得る。

【0147】さらなる実施形態において、上記凝固因子

は変異組織因子を含み得、158位のTrpはArgに変化し；162位のSerはAlaに変化し；164位のGlyはAlaに変化し；または158位のTrpはArgに変化し、かつ162位のSerはAlaに変化し得る。

【0148】さらなる実施形態において、上記凝固因子は短縮型組織因子を含み得る。

【0149】さらなる実施形態において、上記凝固因子は二量体の短縮型組織因子を含み得る。

【0150】さらなる実施形態において、上記凝固因子はラッセルクサリヘビ蛇毒X因子アクチベーターを含み得る。

【0151】さらなる実施形態において、上記凝固因子は血小板活性化化合物を含み得る。

【0152】さらなる実施形態において、上記凝固因子は、トロンボキサンA₂ またはトロンボキサンA₂ シンターゼを含み得る。

【0153】さらなる実施形態において、上記凝固因子は、フィブリン溶解のインヒビターを含み得る。

【0154】さらなる実施形態において、上記凝固因子は α 2-抗プラスミンを含み得る。

【0155】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、凝固因子に結合する第2結合領域に作動可能に連結し得る。

【0156】さらなる実施形態において、上記結合リガンドは、上記第2結合領域に結合した凝固因子をさらに含み得る。

【0157】さらなる実施形態において、上記第2結合領域は、凝固因子に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0158】さらなる実施形態において、上記第2結合領域は、IgG抗体、IgM抗体、あるいは抗体のscFv、Fv、Fab'、FabまたはF(ab')₂フラグメントを含み得る。

【0159】さらなる実施形態において、上記第2結合領域は、ビタミンK依存性II/IIa凝固因子、VII/IIa因子、IX/IXa因子またはX/Xa因子に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0160】さらなる実施形態において、上記第2結合領域は、Gla改変を欠くビタミンK依存性凝固因子に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0161】さらなる実施形態において、上記第2結合領域は、組織因子に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0162】さらなる実施形態において、上記第2結合領域は、変異組織因子に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0163】さらなる実施形態において、上記第2結合領域は、短縮型組織因子に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0164】さらなる実施形態において、上記第2結合領域は、二量体の短縮型組織因子に結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0165】さらなる実施形態において、上記第2結合領域は、ラッセルクサリヘビ蛇毒X因子アクチベーター、トロンボキサンA₂ または α 2-抗プラスミンに結合する抗体の抗原結合性領域を含み得る。

【0166】別の実施形態において、上記第1結合領域は、共有結合を介して上記凝固因子または上記第2結合領域に作動可能に連結し得る。

【0167】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、化学的架橋リンカーを介して上記凝固因子または上記第2結合領域に作動可能に連結し得る。

【0168】さらなる実施形態において、上記結合リガンドは、宿主細胞中で組換えベクターを発現させることによって調製される融合タンパク質であり得、このベクターは、同じリーディングフレーム中に、上記凝固因子または第2結合領域をコードするDNAセグメントに作動可能に連結した上記第1結合領域をコードするDNAセグメントを含み得る。

【0169】別の実施形態において、上記第1結合領域は、アビジン：ビオチンの組み合わせを用いて、上記凝固因子または上記第2結合領域に作動可能に連結し得る。

【0170】別の実施形態において、上記結合リガンドは二重特異性抗体としてさらに規定され得、この二重特異性抗体は、腫瘍細胞、腫瘍関連血管系の成分、または腫瘍関連支質の成分に結合する第1抗原結合性領域を含み、この第1抗原結合性領域は、凝固因子に結合する第2抗原結合性領域に作動可能に連結し得る。

【0171】さらなる実施形態において、上記結合リガンドは、IgG抗体、IgM抗体、あるいは二重特異性抗体のscFv、Fv、Fab'、FabまたはF(ab')₂フラグメントとしてさらに規定され得る。

【0172】さらなる実施形態において、上記結合リガンドは、短縮型組織因子に結合する第2抗原結合性領域に作動可能に連結している、MHCクラスIIタンパク質に結合する第1抗原結合性領域を含む二重特異性抗体としてさらに規定され得る。

【0173】別の局面において、本発明は、以下の

(a) および (b) を含む結合リガンドを提供する：

(a) 腫瘍細胞、腫瘍関連血管系の成分、または腫瘍関連支質の成分に結合する第1結合領域；この第1結合領域が作動可能に連結した

(b) 操作された凝固因子、または操作された凝固因子に結合する第2結合領域。

【0174】1つの実施形態において、上記操作された凝固因子は、Gla改変を欠くビタミンK依存性凝固因子であり得る。

【0175】別の実施形態において、上記操作された凝

固因子は、G1a改変を欠く、I I/I I a凝固因子、V I I/V I I a因子、I X/I X a因子またはX/X a因子であり得る。

【0176】さらなる実施形態において、上記操作された凝固因子は、ビタミンK依存性凝固因子遺伝子を原核宿主中で発現させることによって調製され得る。

【0177】さらなる実施形態において、上記操作された凝固因子は、ビタミンK依存性凝固因子タンパク質を処理して、その対応のグルタミン酸残基を除去または変更することによって調製され得る。

【0178】さらなる実施形態において、上記操作された凝固因子は、対応するグルタミン酸残基を欠くビタミンK依存性凝固因子をコードする操作された凝固因子遺伝子を調製すること、およびこの操作された遺伝子を組換え宿主細胞中で発現させることによって調製され得る。

【0179】さらなる実施形態において、上記操作された凝固因子は、第2の組織因子または誘導体に作動可能に結合した第1の組織因子または誘導体を含む組織因子構築物である。

【0180】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は短縮型組織因子を含み得る。

【0181】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、疎水性膜挿入部分を含み得る。

【0182】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、約3と約20との間の疎水性アミノ酸の連続部分を含む短縮型組織因子を含み得る。

【0183】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は短縮型組織因子を含み得、この短縮型組織因子は、この短縮型組織因子のN末端またはC末端に位置する疎水性アミノ酸の連続部分を含み得る。

【0184】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、脂肪酸を含む短縮型組織因子を含み得る。

【0185】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、2つの短縮型組織因子を含み得、これらの各々は膜挿入部分を含み得る。

【0186】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、ジスルフィド、チオエーテルまたはペプチド結合で作動可能に連結した第1および第2の組織因子または誘導体を含み得る。

【0187】別の実施形態において、上記第1結合領域は、操作された凝固因子に結合する第2結合領域に作動可能に連結し得る。

【0188】なお別の実施形態において、上記第1結合領域は、操作された凝固因子に作動可能に連結し得る。

【0189】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、生物学的に除去可能な結合を介して上記操作された凝固因子に結合し得る。

【0190】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、選択的に切断可能なペプチド結合を介して上記

操作された凝固因子に結合し得る。

【0191】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、ウロキナーゼ、プラスミン、トロンビン、I X a因子、X a因子またはメタロプロテイナーゼに対する切断部位を含むペプチドリンカーを介して、上記操作された凝固因子に結合し得る。

【0192】別の局面において、本発明は、第2の組織因子または誘導体に作動可能に連結した第1の組織因子または誘導体を含む組織因子構築物を提供する。

【0193】1つの実施形態において、上記組織因子構築物は、作動可能に連結された第1、第2および第3の組織因子または組織因子誘導体を含み得る。

【0194】別の実施形態において、上記組織因子構築物は、作動可能に連結された約5個の組織因子または組織因子誘導体を含み得る。

【0195】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、作動可能に連結された約10個の組織因子または組織因子誘導体を含み得る。

【0196】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、作動可能に連結された約20個の組織因子または組織因子誘導体を含み得る。

【0197】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、縮型組織因子を含み得る。

【0198】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、疎水性膜挿入部分を含む短縮型組織因子を含み得る。

【0199】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、約3と約20との間の疎水性アミノ酸の連続部分を含む短縮型組織因子を含み得る。

【0200】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は短縮型組織因子を含み得、この短縮型組織因子は、この短縮型組織因子のN末端またはC末端に位置する疎水性アミノ酸の連続部分を含み得る。

【0201】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、脂肪酸を含む短縮型組織因子を含み得る。

【0202】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、2つの短縮型組織因子を含み得、これらの各々が疎水性膜挿入部分を含み得る。

【0203】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、末端システイン残基を含むように改変された短縮型組織因子を含み得る。

【0204】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は2つの短縮型組織因子を含み得、これらの各々は末端システイン残基を含むように改変され得る。

【0205】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、上記システイン残基に作動可能に連結した抗体または抗体の抗原結合性領域をさらに含み得る。

【0206】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、選択的に切断可能なペプチドリンカーを含むように改変された短縮型組織因子を含み得る。

【0207】さらなる実施形態において、上記選択的に切断可能なペプチドリンカーは、ウロキナーゼ、プラスミン、トロンビン、IXa因子、Xa因子またはメタロプロテイナーゼについての切断部位を含み得る。

【0208】さらなる実施形態において、上記選択的に切断可能なペプチドリンカーは、間質コラゲナーゼ、ゼラチナーゼまたはストロメリシンについての切断部位を含み得る。

【0209】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、上記選択的に切断可能なペプチドリンカーに作動可能に連結した抗体または抗体の抗原結合性領域をさらに含み得る。

【0210】別の実施形態において、上記組織因子構築物は、その配列中に作動可能に連結した一連のユニット：システイン残基、選択的に切断可能なペプチドリンカー、疎水性アミノ酸の連続部分、第1の短縮型組織因子および第2の短縮型組織因子を含み得る。

【0211】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、その配列中に作動可能に連結した一連のユニット：第1のシステイン残基、選択的に切断可能なペプチドリンカー、第1の疎水性アミノ酸の連続部分、第1の短縮型組織因子、第2の短縮型組織因子および第2の疎水性アミノ酸の連続部分を含み得る。

【0212】さらなる実施形態において、上記組織因子構築物は、上記システイン残基に作動可能に連結した抗体または抗体の抗原結合性領域をさらに含み得る。

【0213】さらなる局面において、本発明は、以下の(a)および(b)を含む結合リガンドを薬理学的に受容可能な形態で含む薬学的組成物を提供する：

(a) 疾患細胞、疾患関連血管系の成分、または疾患関連支質の成分に結合する第1結合領域；この第1結合領域が作動可能に連結した

(b) 凝固因子、または凝固因子に結合する第2結合領域。

【0214】1つの実施形態において、上記結合リガンドは、凝固因子に共有結合した第1結合領域を含み得る。

【0215】別の実施形態において、上記結合リガンドは、凝固因子に結合する第2結合領域に共有結合した第1結合領域を含み得る。

【0216】さらなる実施形態において、上記結合リガンドは、上記第2結合領域に非共有結合的に結合した凝固因子をさらに含み得る。

【0217】さらなる実施形態において、上記結合リガンドは二重特異性抗体であり得る。

【0218】さらなる実施形態において、上記第1結合領域は、組織因子、組織因子誘導体、あるいは抗体の抗原結合性領域に作動可能に連結し、この抗体は組織因子または組織因子誘導体に結合し得る。

【0219】なおさらなる局面において、本発明は、適

切な容器手段中に以下の(a)および(b)を含むキットを提供する：

(a) 第1の薬学的組成物であって、疾患関連血管系または疾患関連支質における標的抗原の発現を誘導し得る生物学的薬剤を含む、第1の薬学的組成物；および

(b) 第2の薬学的組成物であって、以下の(i)および(ii)を含む結合リガンドを含む、第2の薬学的組成物：

(i) 疾患関連血管系または疾患関連支質の誘導性標的抗原に結合する第1結合領域；この第1結合領域が作動可能に連結した(ii)凝固因子、または凝固因子に結合する第2結合領域。

【0220】1つの実施形態において、上記第1の薬学的組成物は、疾患関連血管内皮細胞上の標的抗原の発現を誘導し得る生物学的薬剤を含み得る。

【0221】別の実施形態において、上記第1の薬学的組成物は、白血球細胞の細胞表面上の活性化抗原および血管化腫瘍の腫瘍細胞の細胞表面上の腫瘍抗原に結合する二重特異性抗体を含み得る。

【0222】さらなる実施形態において、上記第1の薬学的組成物は、活性化抗原CD2、CD3、CD14、CD16(IgEについてはFcR)、CD28またはT細胞レセプター抗原に結合する二重特異性抗体を含み得る。

【0223】さらなる実施形態において、上記第1の薬学的組成物は、CD14に結合し、そして単球/マクロファージ細胞によるIL-1の発現を誘導する二重特異性抗体を含み得る。

【0224】さらなる実施形態において、上記第2の薬学的組成物は、E-セレクトリンに結合する第1結合領域を含む結合リガンドを含み得る。

【0225】さらなる実施形態において、上記第1の薬学的組成物は、CD28に結合し、そしてT細胞によるIFN- γ の発現を誘導する二重特異性抗体を含み得る。

【0226】さらなる実施形態において、上記第2の薬学的組成物は、MHCクラスII抗原に結合する第1結合領域を含む結合リガンドを含み得る。

【0227】さらなる実施形態において、上記キットは、正常組織の血管内皮細胞におけるMHCクラスII抗原の発現を抑制し得る抗原を含む、第3の薬学的組成物をさらに含み得る。

【0228】さらなる実施形態において、上記キットは、シクロスポリンを含む第3の薬学的組成物をさらに含み得る。

【0229】さらなる実施形態において、上記第1の薬学的組成物は、腫瘍抗原p185^{HER2}、乳汁ムチンコアタンパク質、TAG-72、ルイスa、ガン胎児性抗原(CEA)、または腫瘍関連抗原に結合する二重特異性抗体を含み得、この腫瘍関連抗原は、9.2.2

7、OV-TL3、MOV18、B3、KS1/4、260F9およびD612からなる群から選択される抗体に結合し得る。

【0230】別の実施形態において、上記第1の薬学的組成物は、疾患関連支質成分における標的抗原の発現を誘導し得る生物学的薬剤を含み得る。

【0231】さらなる実施形態において、上記第1の薬学的組成物は、腫瘍細胞または腫瘍支質の成分；および組織因子、組織因子誘導體、プロトロンビン、VII/VIIa因子、IX/IXa因子、X/Xa因子、XI/XIa因子またはラッセルクサリヘビ蛇毒X因子アクチベーターに結合する二重特異性抗体を含み得る。

【0232】さらなる実施形態において、上記第2の薬学的組成物は、P-セレクチンに結合する第1結合領域を含む結合リガンドを含み得る。

【0233】さらなる実施形態において、上記第2の薬学的組成物は、E-セレクチンに結合する第1結合領域を含む結合リガンドを含み得る。

【0234】なお別の局面において、本発明は、疾患関連血管系に凝固因子を送達するための医薬の調製における結合リガンドの使用を提供し、この結合リガンドは、以下の(a)および(b)を含む：

(a) 疾患細胞、疾患関連血管系の成分、または疾患関連支質の成分に結合する第1結合領域；この第1結合領域が作動可能に連結した

(b) 凝固因子、または凝固因子に結合する第2結合領域。

【0235】1つの実施形態において、上記結合リガンドは、外因性凝固因子を疾患関連血管系に送達するための医薬の調製において使用され得、この結合リガンドは、凝固因子に共有結合した第1結合領域を含み得る。

【0236】他の実施形態において、上記結合リガンドは、外因性凝固因子を疾患関連血管系に送達するための医薬の調製において使用され得、この結合リガンドは、凝固因子に非共有結合的に結合する第2結合領域に共有結合した第1結合領域を含み得る。

【0237】別の実施形態において、上記結合リガンドは、外因性凝固因子を疾患関連血管系に送達するための医薬の調製において使用され得、この結合リガンドは、外因性凝固因子に結合する第2結合領域に共有結合した第1結合領域を含み得、そしてこの医薬を動物に投与するとこの因子を疾患関連血管系に集中させ得る。

【0238】なお別の実施形態において、上記医薬は、良性前立腺肥大症(BPH)、糖尿病性網膜症、血管再狭窄、動静脈性奇形(AVM)、血管腫、血管新生緑内障、慢性関節リウマチまたは乾癬の処置において使用されることが意図され得る。

【0239】さらに別の実施形態において、上記医薬は、血管化腫瘍を有する動物の処置において使用されることが意図され得る。

【0240】さらなる実施形態において、上記医薬は、動物の腫瘍関連血管系または腫瘍関連支質における標的化可能な成分の発現の誘導の後に使用されることが意図され得、この医薬は、誘導された標的化可能な成分に結合する第1結合領域を含む結合リガンドを含み得る。

【0241】さらなる実施形態において、腫瘍関連血管系における上記標的化可能な成分の発現は、サイトカインによって誘導され得る。

【0242】さらなる実施形態において、腫瘍関連血管系における上記標的化可能な成分の発現は、上記動物の白血球細胞から放出されるサイトカインによって誘導され得る。

【0243】さらなる実施形態において、腫瘍関連血管系における上記標的化可能な成分の発現は、上記動物の単球、マクロファージ、マスト細胞、ヘルパーT細胞、CD8-陽性T細胞またはNK細胞から放出されるサイトカインによって誘導され得る。

【0244】さらなる実施形態において、腫瘍関連血管系における上記標的化可能な成分の発現は、サイトカインIL-1、IL-4、TNF- α 、TNF- β またはIFN- γ によって誘導され得る。

【0245】さらなる実施形態において、上記動物の上記白血球細胞は、白血球細胞表面活性化抗原に結合する活性化抗体を含む薬学的組成物をこの動物に投与することによって活性化されて、サイトカインを放出し得る。

【0246】さらなる実施形態において、上記活性化抗体は、白血球細胞表面活性化抗原CD2、CD3、CD14、CD16、IgEについてのFcR、CD28またはT細胞レセプター抗原に結合し得る。

【0247】さらなる実施形態において、上記活性化抗体は、動物腫瘍内で、活性化された白血球および腫瘍細胞に結合および架橋する二重特異性抗体であり得る。

【0248】さらなる実施形態において、上記活性化抗体は、CD14またはCD28、および腫瘍細胞の細胞表面抗原に結合する二重特異性抗体であり得る。

【0249】さらなる実施形態において、上記E-セレクチン、VCAM-1、ICAM-1、エンドグリンまたはMHCクラスII抗原の発現は、腫瘍関連血管系において誘導され得る。

【0250】さらなる実施形態において、上記E-セレクチンの発現は、腫瘍関連血管系において誘導され得る。

【0251】さらなる実施形態において、上記MHCクラスII抗原の発現は、腫瘍関連血管系において誘導され得る。

【0252】さらなる実施形態において、動物の正常組織における内皮細胞による上記MHCクラスII抗原の発現は、この動物へのシクロスポリンの投与によって抑制され得；そして、次いで腫瘍関連血管系におけるMHCクラスII抗原の発現は、CD28および腫瘍細胞の

細胞表面抗原に結合する二重特異性抗体のこの動物への投与によって誘導され得る。

【0253】さらなる実施形態において、動物の正常組織における内皮細胞による上記MHCクラスII抗原の発現は、この動物のT細胞におけるIFN- γ 産生を抑制する抗CD4抗体のこの動物への投与によって抑制され得；そして、次いで腫瘍関連血管系におけるMHCクラスII抗原の発現は、上記疾患部位中の抗原に結合するIFN- γ 産生T細胞クローンのこの動物への投与によって誘導され得る。

【0254】さらなる実施形態において、上記IFN- γ 産生T細胞クローンは、以下：

(a) この動物の疾患部位から組織断片を取り出す工程；

(b) この疾患部位から、浸潤した白血球を抽出する工程；および

(c) この浸潤した白血球をインビトロで拡大させてIFN- γ 産生クローンを提供する工程、を包含する方法によって調製され得る。

【0255】さらなる実施形態において、腫瘍関連血管系における上記標的化可能な成分の発現は、トロンビンによって誘導され得る。

【0256】さらなる実施形態において、上記トロンビンの産生は、腫瘍細胞または腫瘍支質の成分、および組織因子、組織因子誘導體、プロトロンビン、VII/VIIa因子、IX/IXa因子、X/Xa因子、XI/XIa因子またはラッセルクサリヘビ蛇毒X因子アクチベーターに結合する二重特異性抗体を含む薬学的組成物を動物に投与することによって誘導され得る。

【0257】さらなる実施形態において、上記P-セレクチンの発現は、腫瘍関連血管系において誘導され得る。

【0258】さらなる実施形態において、上記E-セレクチンの発現は、腫瘍関連血管系において誘導され得る。

【0259】なおさらなる局面において、本発明は、ガンを処置するための医薬の調製における凝固性結合リガンドの使用を提供し、この結合リガンドは、以下の

(a) および(b)を含む：

(a) 腫瘍細胞、腫瘍関連血管系の成分、または腫瘍関連支質の成分に結合する第1結合領域；この第1結合領域が作動可能に連結した

(b) 凝固因子、または凝固因子に結合する第2結合領域。

【0260】1つの実施形態において、上記医薬は、非経口投与のための処方物であり得る。

【0261】他の実施形態において、上記医薬は、血管化腫瘍部位中に注入されるための処方物であり得る。

【0262】別の実施形態において、上記医薬は、ヒト患者における使用に適している。

【0263】なお別の実施形態において、上記凝固性結合リガンドは、組織因子、短縮型組織因子、二量体組織因子、あるいは組織因子または組織因子誘導體に結合する抗体の抗原性結合領域に作動可能に連結した第1結合領域を含み得る。

【0264】

【発明の実施の形態】モノクローナル抗体(MAb)およびイムノトキシン(IT)は、リンパ腫および白血病の治療に大きな可能性を示している(Lowderら、1987。Vitettaら、1991)が、ヒトの全てのガンの90%以上を占める(Shockleyら、1991)ガン腫およびその他の固形腫瘍に対しては、現在のところ臨床治験において比較的非効果的であることがわかっている(ByersおよびBaldwin、1988。AbramsおよびOldham、1985)。この主な理由は、高分子は容易には固形腫瘍中に浸出せず(Sands、1988。Epenetosら、1986)、いったん腫瘍塊中に入ると、腫瘍細胞間の緊密な結合(Dvorakら、1991)、繊維間質(Baxterら、1991)、間隙圧力勾配(Jain、1990)、および結合部位バリア(Juwei dら、1992)の存在のために均一に分布し得ないためである。

【0265】従って、固形腫瘍を処置するための新しい戦略の開発において、腫瘍細胞そのものよりも腫瘍の血管系を標的化する工程を包含する方法は、ある種の利点を提供すると思われる。例えば腫瘍血管系特異的フィブリン形成による腫瘍を通る血流の障害の誘導は、腫瘍部位における流入および流出プロセスを妨害し、従って抗腫瘍効果が生じる。腫瘍への血液供給を停止させることは、腫瘍関連血管における凝固促進-フィブリン溶解バランスを、凝固剤(coagulating agent)に特異的に曝すことによって凝固プロセス側にシフトすることを通じて達成され得る。

【0266】本発明は、腫瘍特異的凝固に代表される特異的な血液凝固を得るための、様々な手段を提供する。これは、少なくとも一つの成分が免疫的標的化成分または成長因子ベースの標的化成分であり、凝固を直接的または間接的に刺激し得る少なくとも一つの他の成分が用いられる、二重特異性または多重特異性の結合リガンドを用いることによって達成される。

【0267】(A. 標的化可能疾患部位) 本発明によって提供される組成物および方法は、血管部分を有する良性または悪性腫瘍などのいずれの疾患の処置にも幅広く適用可能である。このような血管系関連疾患は、BPH、糖尿病性網膜症、血管再狭窄、動静脈性奇形(AVM)、髄膜腫、血管腫、血管新生緑内障および乾癬、ならびに血管線維腫、関節炎、アテローム性動脈硬化プラーク、角膜移植血管新生、血友病関節、過形成性癰疽、osler-weber症候群(osler-webe

rsyndrome)、化膿肉芽腫、後水晶体繊維増殖症、鞏皮症、トラコーマ、血管接着、滑膜炎、皮膚炎および子宮内膜症さえも含む。

【0268】代表的な血管形成性腫瘍は、酸素および栄養素の供給のために血管部分を必要とする固形腫瘍、特にガン腫である。本発明を用いて処置され得る固形腫瘍の例は、肺、胸部、卵巣、胃、脾臓、喉頭、食道、精巣、肝臓、耳下腺、胆管、結腸、直腸、子宮頸部、子宮、子宮内膜、腎臓、膀胱、前立腺、および甲状腺のガン腫、扁平上皮細胞ガン腫、腺ガン腫、小細胞ガン腫、メラノーマ、神経膠腫、神経芽腫などを含むがこれに限定されない。

【0269】本発明の二重特異性剤の一つの結合領域は、凝固剤を腫瘍領域に送達し得る、すなわち上記に示すような腫瘍部位に局在化させることが可能な成分である。凝固剤は、若干広く分布しても、トキシン部分の場合において発生が知られているような激しい副作用を伴わないため、二重特異性リガンドの標的化成分に対する必要条件は比較的厳密ではない。標的化剤は従って、腫瘍細胞成分、腫瘍血管系成分、腫瘍細胞に結合するまたは一般的に関連する成分、腫瘍血管系に結合するまたは一般的に関連する成分、腫瘍細胞外マトリックスまたは間質の成分、および腫瘍血管系中に見られる細胞型さえも対象とし得る。

【0270】例えばイムノトキシンをを用いる場合に必要となる非常に厳密な標的化という問題は、腫瘍血管系は「プロトロンビン産生性 (prothrombotic)」であり凝固傾向にあるという事実によってもまた軽減される。従って、特異的標的化手段を達成することにより、凝固は非腫瘍部位中の血管系よりも腫瘍血管系において促進される。従って、特異的標的化は、標的化剤の生物分布特性に関連する純粋に物理的な用語というよりもむしろ、機能的な用語であり、有用な標的が完全に腫瘍に制限されず、腫瘍特異性凝固の促進に有効な標

的化リガンドが投与後に身体の他の部位で見出されることはあり得ないことではない。

【0271】(1. 腫瘍細胞標的) 腫瘍を構成する悪性細胞は、腫瘍細胞の比較的特異的なマーカーに結合可能な領域を有する二重特異性リガンドを用いて標的化され得る。腫瘍細胞への結合が、結合した凝固剤を腫瘍へ局在化させることにより、特異的な凝固が達成される。更に、血管周辺腫瘍細胞への物理的な接近可能性に起因して血管に最も近い腫瘍細胞付近に二重特異性剤が集中する可能性が高いために、これは凝固を促進するための特に効果的な手段であることが予想される。

【0272】多くのいわゆる「腫瘍抗原」が記載されているが、そのいずれも本発明において標的として用いることが可能である。固形腫瘍関連抗原の例を多数、本明細書中の表 I 中に列挙した。このような抗原に対する抗体の調製および使用は、十分に当該技術の範囲内であり、抗体例も同時に表 I に列挙しておく。

【0273】標的化可能腫瘍を規定するもう一つの手段は、腫瘍細胞によって発現された抗原の生化学的特性を記載するのではなく、腫瘍細胞そのものの特性を考慮して説明される。従って、(ATCC カタログから) 公的に入手可能なヒト腫瘍細胞株を例示する意味で表 II を提供する。

【0274】表 II に提供した情報は一例であり、年度または範囲による制限は意図していない。任意の後年の ATCC カタログを参照することによって、他の適切な細胞株を同定することが可能である。また、特定の細胞型が所望であるならば、そのような細胞を得るための手段および/またはその即時入手可能な供給源は、当該技術分野の当業者に公知である。従って、科学文献の分析により、標的化することを所望する任意の腫瘍細胞型の細胞について適切な選択を容易に行い得る。

【0275】

【表 1】

表 I
固形腫瘍および
相当するモノクローナル抗体のマーカ抗原

腫瘍部位	抗原特性 / 特徴	モノクローナル抗体	参考文献
A: 婦人科	'CA 125' >200 kD ムタン GP	OC 125	Kabawat § , 1983; Szymendera, 1986
GY			
卵巣	80 kD GP	OC 133	Maouko § , Cancer Res., 1984
卵巣	'SGA' 360 kD GP	OMI	de Kraker § , 1986
卵巣	高 M _r ムタン	Mo v1	Miotti § , Cancer Res., 1985
卵巣	高 M _r ムタン / 糖脂質	Mo v2	Miotti § , Cancer Res., 1985
卵巣	NS	3C2	Tsuji § , Cancer Res., 1985
卵巣	NS	4C7	Tsuji § , Cancer Res., 1985
卵巣	高 M _r ムタン	ID ₇	Gangopadhyay § , 1985
卵巣	高 M _r ムタン	DU-PAN-2	Lan § , 1985
GY	7700 kD GP	F 36/22	Croghan § , 1984
卵巣	'qp 68' 48 kD GP	4F ₇ /7A ₁₀	Bhattacharya § , 1984
GY	40, 42kD GP	OV-TL3	Poels § , 1986
GY	'TAG-72' 高 M _r ムタン	B72.3	Thor § , 1986

表 I 続き

腫瘍部位	抗原特性 / 特徴	モノクローナル抗体	参考文献
卵巣	300-400 kD GP	DF ₃	Kufe § , 1984
卵巣	60 kD GP	2C ₈ /2F ₇	Bhattacharya § , 1985
GY	105 kD GP	MF 116	Mattes § , 1984
卵巣	38-40 kD GP	MOV18	Miotti § , 1987
GY	'CEA' 180 kD GP	CEA 11-H5	Wagenor § , 1984
卵巣	CA 19-9 糖鎖 GICA	CA 19-9 (1116NS 19-9)	Atkinson § , 1982
卵巣	'PLAP' 67 kD GP	H17-E2	McDicken § , 1985
卵巣	72 kD	791T/36	Perkins § , 1985
卵巣	69 kD PLAP	NDOG ₂	Sunderland § , 1984
卵巣	未知 M _r PLAP	H317	Johnson § , 1981
卵巣	p185 ^{HER2}	4D5, 3H4, 7C2, 6E9, 2C4, 7F3, 2H11, 3E8, 5B8, 7D3, SB8	Shepard § , 1991
子宮 卵巣	HMG-2	HMG2	Epenetos § , 1982
GY	HMG-2	3.14.A3	Burchall § , 1983

表 I 続き

腫瘍部位	抗原特性/特徴	モノクローナル抗体	参考文献
B: 胸腺	330-450 Kd GP	DF3	Hayes § , 1985
	NS	NCRC-11	Ellis § , 1984
	37kD	3C6F9	Mandeville § , 1987
	NS	MBE6	Teramoto § , 1982
	NS	CLNH5	Glassy § , 1983
	47 Kd GP	MAC 40/43	Kjeldsen § , 1986
	高 M _r GP	EMA	Sloane § , 1981
	高 M _r GP	HMF61 HMF62	Arklie § , 1981
	NS	3.15.C3	Arklie § , 1981
	NS	M3, M8, M24	Foster § , 1982
	1 (Ma) 血漿群 A _u	M18	Foster § , 1984
	NS	67-D-11	Rasmussen § , 1982
	エリトロシン レセプター	D547Sp, D75D3, H222	Kinsel § , 1989
	EGF レセプター	Ant1-EGF	Sainsbury § , 1985
	Laminin レセプター	LR-3	Horan Hand § , 1985
	erb B-2 p185	TA1	Gusterson § , 1988
	NS	H59	Hendler § , 1981

表 I 続き

腫瘍部位	抗原特性/特徴	モノクローナル抗体	参考文献
	126 Kd GP	10-3D-2	Soule § , 1983
	NS	HmAB1,2	Imam § , 1984; Schlom § , 1985
	NS	MBR 1,2,3	Menard § , 1983
	95 Kd	24-17-1	Thompson § , 1983
	100 Kd	24-17-2 (3E1-2)	Croghan § , 1983
	NS	F36/22.M7/10 §	Croghan § , 1984
	24 Kd	C11, G3, H7	Adams § , 1983
	90 Kd GP	B6-2	Colcher § , 1981
	CEA & 180 Kd GP	B1-1	Colcher § , 1983
	Ca 19-9 に類似した 結腸および膵臓の ムチン	Cam 17-1	Imperial Cancer Research Technology Mab listing
	乳汁 ムチン核 タンパク質	SM3	Imperial Cancer Research Technology Mab listing
	乳汁 ムチン核 タンパク質	SM4	Imperial Cancer Research Technology Mab listing
	アフリニター精製した 乳汁 ムチン	C-Mu1 (566)	Imperial Cancer Research Technology Mab listing

表 I 続き

腫瘍部位	抗原特性 / 特徴	モノクローナル抗体	参考文献
	p185 ^{HER2}	4D5, 3H4, 7C2, 6E9, 2C4, 7F3, 2H11, 3E8, 5B8, 7D3, 5B8	Shepard <i>S</i> , 1991
	CA 125 >200 Kd GP	OC 125	Kabawat <i>S</i> , 1985
	高 M _r ムタン / 糖脂質	MO v2	Miotto <i>S</i> , 1985
	高 M _r ムタン	DU-PAN-2	Lan <i>S</i> , 1984
	'qp48' 48 Kd GP	4F ₇ /7A ₁₀	Bhattacharya <i>S</i> , 1984
	300-400 Kd GP	DF ₃	Kufe <i>S</i> , 1984
	'TAG-72' 高 M _r ムタン	B72.3	Thor <i>S</i> , 1986
	'CEA' 180 Kd GP	ccccCEA 11	Wagener <i>S</i> , 1984
	'ELAP' 67 Kd GP	H17-E2	McDicken <i>S</i> , 1985
	HMEG-2 >400 Kd GP	3.14-A3	Burchell <i>S</i> , 1983
	NS	FO23C5	Riva <i>S</i> , 1988
G: 結腸直腸	TAG-72 高 M _r ムタン	B72.3	Colcher <i>S</i> , 1987
	GP37	(17-1A) 1083-17-1A	Paul <i>S</i> , 1986

表 I 続き

腫瘍部位	抗原特性 / 特徴	モノクローナル抗体	参考文献
	表面 GP	CO17-1A	LoBuglio <i>S</i> , 1988
	CEA	ZCE-025	Palt <i>S</i> , 1988
	CEA	AB2	Griffin <i>S</i> , 1988a
	細胞表面 AG	HT-29-15	Cohn <i>S</i> , 1987
	分泌性上皮	250-30.6	Leyden <i>S</i> , 1986
	表面糖タンパク質	44X14	Gallagher <i>S</i> , 1986
	NS	A7	Takahashi <i>S</i> , 1988
	NS	GA73-3	Munz <i>S</i> , 1986
	NS	791T/3G	Farrans <i>S</i> , 1982
	細胞膜および 細胞質 Ag	28A32	Smith <i>S</i> , 1987
	CEA およびヒンゲジン	2B.19.8	Corvalen, 1987
	gp72	X MMCO-791	Byers <i>S</i> , 1987
	高 M _r ムタン	DU-PAN-2	Lan <i>S</i> , 1985
	高 M _r ムタン	ID ₃	Gangopadhyay <i>S</i> , 1985
	CEA 180 Kd GP	CEA 11-H5	Wagener <i>S</i> , 1984
	60 Kd GP	2C ₈ /2F ₇	Bhattacharya <i>S</i> , 1985

表 I 続き

腫瘍部位	抗原特性/特徴	モノクローナル抗体	参考文献
	CA-19-9 (糖基 GICA)	CA-19-9 (1116NS 19-9)	Atkinson S, 1982
	Lewis a	PR5C5	Imperial Cancer Research Technology Mab Listing
	Lewis a	PR4D2	Imperial Cancer Research Technology Mab Listing
	結腸粘液	PR4D1	Imperial Cancer Research Technology Mab Listing
D: 黒色腫	p97 ^a	4-1	Woodbury S, 1980
	p97 ^a	8-2 M ₁₂	Brown, S, 1981a
	p97 ^b	96-5	Brown, S, 1981a
	p97 ^c	118-1, 133-2, (113-2)	Brown, S, 1981a
	p97 ^c	L ₁ , L ₁₀ , R ₁₀ (R ₁₉)	Brown S, 1981b
	p97 ^d	I ₁₂	Brown S, 1981b
	p97 ^e	K ₅	Brown S, 1981b
	p155	6-1	Loop S, 1981
	G ₀₃ ギンプログノシンド	R24	Dippold S, 1980

表 I 続き

腫瘍部位	抗原特性/特徴	モノクローナル抗体	参考文献
	p210, p60, p250	5-1	Loop S, 1981
	p280 p440	225.28S	Wilson S, 1981
	GP 94, 75, 70 & 25	465.12S	Wilson S, 1981
	P240-P250, P450	9-2-27	Reisfeld S, 1982
	100, 77, 75 Kd	F11	Chee S, 1982
	94 Kd	376.96S	Imai S, 1982
	4 GP 5 ^変	465.12S	Imai S, 1982; Wilson S, 1981
	GP 74	15-75	Johnson ^変 Reithmuller, 1982
	GP 49	15-95	Johnson ^変 Reithmuller, 1982
	230 Kd	Me1-14	Carrel S, 1982
	92 Kd	Me1-12	Carrel S, 1982
	70 Kd	Me3-TB7	Carrel S, 1:387, 1982
	9-2-27 AG に類似 LE HMW MAA	225.28SD	Kantor S, 1982
	9-2-27 に類似 LE HMW MAA	763.24TS	Kantor S, 1982
	376-96S 465-12S に 類似 LE GP95	705P6	Stuhlmüller S, 1982
	GP125	436910	Saxton S, 1982

表 1 続き

腫瘍部位	抗原特性/特徴	モノクローナル抗体	参考文献
	CD41	M148	Imperial Cancer Research Technology Mab listing
<u>Es: 胃腸</u>	高 M_r ムチン	ID3	Gangopadhyay <i>S'</i> , 1985
膵臓, 胃			
胆嚢, 膵臓, 胃	高 M_r ムチン	DU-PAN-2	Lan <i>S'</i> , 1985
膵臓	NS	OV-TL3	Poels <i>S'</i> , 1984
膵臓, 胃, 食道	'TAG-72' 高 M_r ムチン	B72-3	Thor <i>S'</i> , 1986
胃	'CEA' 180 Kd GP	CEA 11 H5	Wagener <i>S'</i> , 1984
膵臓	HMPG-2 >400 Kd GP	3-14-A3	Burchell <i>S'</i> , 1983
G-I	NS	C COLI	Lemkin <i>S'</i> , 1984
膵臓, 胃	CA 19-9 (糖鎖 GICA)	CA-19-9 (1116NS 19-9) <i>gly</i> CA50	Szymendera, 1986
膵臓	CA125 GP	OC125	Szymendera, 1986

表 1 続き

腫瘍部位	抗原特性/特徴	モノクローナル抗体	参考文献
<u>Es: 肺</u>	p185 ^{HER2}	4D5 3H4, 7C2, 6E9, 2C4, 7F3, 2H11, 3E8, 5B8, 7D3, 5B8	Shepard <i>S'</i> , 1991
非小細胞 肺癌			
	高 M_r ムチン/ 糖脂質	MO v2	Miotto <i>S'</i> , 1985
	'TAG-72' 高 M_r ムチン	B72-3	Thor <i>S'</i> , 1986
	高 M_r ムチン	DU-PAN-2	Lan <i>S'</i> , 1985
	'CEA' 180 kD GP	CEA 11-H5	Wagener <i>S'</i> , 1984
悪性神経膠腫	85HG-22細胞由来 細胞質抗原	MUC 8-22	Stavrou, 1990
	85HG-63細胞由来 細胞表面 Ag	MUC 2-63	Stavrou, 1990
	86HG-39細胞由来 細胞表面 Ag	MUC 2-39	Stavrou, 1990

表 I 続き

腫瘍部位	抗原特性 / 特徴	モノクローナル抗体	参考文献
	胚H9-29細胞由来の細胞表面Ag	MUC 7-39	Stavrou, 1990
G1 腫瘍	p73	PAb 240 PAb 246 PAb 1801	Imperial Cancer Research Technology MaB Listing
小円形細胞腫瘍	神経細胞接着分子	ERIC-1	Imperial Cancer Research Technology MaB Listing
髄芽腫 神経芽細胞腫 横紋筋白腫		M149	Imperial Cancer Research Technology MaB Listing
神経芽細胞腫		FMH25	Imperial Cancer Research Technology MaB Listing
腎臓がんおよび Wilms 腫瘍	p155	6-1	Loop 5, 1981
膀胱がんおよび 嚢頭がん	"Ca 抗原" 350- 390 kD	CA1	Ashall 5, 1982
神経芽細胞腫	GD2	3F8	Cheung 5, 1986
前立腺	gp48 48 kD GP	4F7/7A10	Bhattacharya 5, 1984
前立腺	60 kD GP	2C8/2F7	Bhattacharya 5, 1985

表 I 続き

腫瘍部位	抗原特性 / 特徴	モノクローナル抗体	参考文献
甲状腺	'CEA' 180 kD GP	CEA 11-H5	Wagener 5, 1984

略語: Ab、抗体; Ag、抗原; EGF、表皮成長因子; GI、胃腸; GICA、胃腸関連抗原; GP、糖タンパク質; GY、婦人科; HMFG、ヒト乳汁脂肪乳球; Kd、キロダルトン; Mabs、モノクローナル抗体; Mr、分子量; NS、特定されていない; PLAP、胎盤のアルカリホスファターゼ; TAG、腫瘍関連糖タンパク質; CEA、ガン胎児性抗原。

脚注: CA 19-9 Ag (GICA) は、シアロシルフコシルラクトテトラオシルセラミド (シアリル化Lewisペンタグリコシルセラミドまたはシアリル化ラクト-N-フコペンタオースIIとも称される); p97 Agは、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであると考えられる; Mab 9-2-27と反応性の抗原は、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンに関連したシアリル化糖タンパク質であると考えられる; 特記しない限り、GYは、頸、内頸、子宮内膜、ファローピウス管、卵巣、膈、または混合性ミューラー腫瘍のガンを包含し得る; 特記しない限り、GIは、肝臓、小腸、脾臓、膵臓、胃、および食道のガンを包含し得る。

II
ヒトの腫瘍細胞株および起源

ATTC HTB 番号	細胞株	腫瘍のタイプ
1	J82	移行細胞ガン、膀胱
2	RT4	移行細胞乳頭腫、膀胱
3	ScasHER	扁平上皮ガン、膀胱
4	T24	移行細胞ガン、膀胱
5	TCCSUP	移行細胞ガン、膀胱、初代グレードIV
9	5637	ガン、膀胱、初代
10	SK-N-MC	神経芽細胞腫、脳脊髄領域に転移
11	SK-N-SH	神経芽細胞腫、骨髄に転移
12	SW 1088	星状細胞腫
13	SW 1783	星状細胞腫
14	U-87 MG	グリア芽細胞腫、星状細胞腫、グレードIII
15	U-118 MG	グリア芽細胞腫
16	U-138 MG	グリア芽細胞腫
17	U-373 MG	グリア芽細胞腫、星状細胞腫、グレードIII
18	Y79	網膜芽腫
19	HT-20	ガン、胸部
20	HT-474	腺癌ガン、胸部
22	MCF7	乳腺ガン、胸膜浸出液
23	MDA-MB-134-VI	胸部、腺癌ガン、胸膜浸出液
24	MDA-MD-157	胸部肉腫、ガン、胸膜浸出液
25	MDA-MB-175-VII	胸部、腺癌ガン、胸膜浸出液
27	MDA-MB-361	腺癌ガン、胸部、脳に転移

表 II 続き

ATTC HTB 番号	細胞株	腫瘍の由来
30	SK-BR-3	腺ガン、胸部、 悪性胸膜浸出液
31	C-33 A	ガン、頸
32	HT-3	ガン、頸、 リンパ節に転移
33	ME-180	類表皮ガン、頸、 網に転移
34	MS751	類表皮ガン、頸、 リンパ節に転移
35	SiHa	扁平上皮ガン、頸
36	JEG-3	絨毛ガン
37	Caco-2	腺ガン、結腸
38	HT-29	腺ガン、結腸、 中程度によく分化したグレードII
39	SK-CO-1	腺ガン、結腸、腹水
40	HuTu 80	腺ガン、十二指腸
41	A-253	類表皮ガン、 顎下腺
43	FaDu	扁平上皮細胞ガン、咽頭
44	A-498	ガン、腎臓
45	A-704	腺ガン、腎臓
46	Caki 1	明細胞ガン、 腎臓の初代に一致、 皮膚に転移
47	Caki 2	明細胞ガン、 腎臓の初代に一致
48	SK-NEP-1	ウィルムス腫瘍、胸膜浸出液
49	SW 839	腺ガン、腎臓
52	SK-HEP-1	腺ガン、肝臓、腹水
53	A-427	ガン、肺
54	Calu-1	類表皮ガン グレードIII、 肺、胸膜に転移
55	Calu-3	腺ガン、肺、 胸膜浸出液
56	Calu-6	未分化ガン、 おそらく肺

表 II 続き

ATTC HTB 番号	細胞株	腫瘍のタイプ
57	SK-LU-1	腺ガン、 不十分な分化に一致する肺、 グレードIII
58	SK-MES-1	扁平上皮ガン、肺、 胸膜浸出液
59	SW 900	扁平上皮細胞ガン、肺
60	EB1	バーキットリンパ腫、上顎上部
61	EB2	バーキットリンパ腫、卵巣
62	P3HR-1	バーキットリンパ腫、腹水
63	HT-144	悪性黒色腫、 皮下組織に転移
64	Malme-3M	悪性黒色腫、 肺に転移
66	RPMI-7951	悪性黒色腫、 リンパ節に転移
67	SK-MEL-1	悪性黒色腫、 リンパ系に転移
68	SK-MEL-2	悪性黒色腫、 大腿の皮膚に転移
69	SK-MEL-3	悪性黒色腫、 リンパ節に転移
70	SK-MEL-5	悪性黒色腫、 腋窩節に転移
71	SK-MEL-24	悪性黒色腫、 結節に転移
72	SK-MEL-28	悪性黒色腫
73	SK-MEL-31	悪性黒色腫
75	Caov-3	腺ガン、卵巣、 初代に一致
76	Caov-4	腺ガン、卵巣、 ファローピウス管の漿膜下に転移
77	SK-OV-3	腺ガン、卵巣、 悪性腹水
78	SW 626	腺ガン、卵巣
79	Capan-1	腺ガン、膵臓、 肝臓に転移
80	Capan-2	腺ガン、膵臓

表 II 続き

ATTC HTE 番号	細胞株	腫瘍のタイプ
81	DU 145	ガン、前立腺、 脳に転移
82	A-204	横紋筋肉腫、初代
85	SaOs-2	骨原性肉腫、
86	SK-ES-1	未分化骨原性肉腫対ユーイング肉腫、 骨
88	SK-LMS-1	平滑筋肉腫、外陰部、初代
91	SW 684	繊維肉腫
92	SW 872	脂肪肉腫
93	SW 982	股関節滑膜肉腫
94	SW 1353	軟骨肉腫、上腕骨
96	U-2 OS	骨原性肉腫、骨初代
102	Malme-3	皮膚繊維芽細胞
103	KATO III	胃ガン
104	Cate-1B	胎生期ガン、卵巣、 リンパ節に転移
105	Tera-1	胎生期ガン、 肺への転移に一致する悪性度
106	Tera-2	胎生期ガン、 肺への転移に一致する悪性度
107	SW579	甲状腺肉腫
111	AN3 CA	子宮内膜の腺ガン、 転移性
112	HEC-1-A	子宮内膜の腺ガン
113	HEC-1-B	子宮内膜の腺ガン
114	SK-UT-1	子宮、 混合性中胚葉腫瘍、 平滑筋肉腫グレードIIIに一致する
115	SK-UT-1B	子宮、 混合性中胚葉腫瘍、 平滑筋肉腫グレードIIIに一致する
117	SW 954	扁平上皮細胞肉腫、外陰部
118	SW 962	ガン、外陰部、 リンパ節転移
119	NCI-H69	小細胞ガン、肺

表 II 続き

ATTC HTB 番号	細胞株	腫瘍のタイプ
120	NCI-H128	小細胞ガン、肺
121	BT-483	腺管ガン、胸部
122	BT-549	腺管ガン、胸部
123	DU4475	転移性の皮膚の結節、 乳ガン
124	HBL-100	胸部
125	Hs 578Bst	胸部、正常
126	Hs 578T	腺管ガン、胸部
127	MDA-MB- 330	ガン、胸部
128	MDA-MB- 415	腺ガン、胸部
129	MDA-MB- 435S	腺管ガン、胸部
130	MDA-MB- 436	腺ガン、胸部
131	MDA-MB- 453	ガン、胸部
132	MDA-MB- 468	腺ガン、胸部
133	T-47D	腺管ガン、胸部、 胸膜浸出液
134	Hs 766T	ガン、脾臓 リンパ節に転移
135	Hs 746T	ガン、胃、 左足に転移
137	Hs 695T	メラニン欠乏性黒色腫、 リンパ節に転移
138	Hs 683	神経膠腫
140	Hs 294T	黒色腫、 リンパ節に転移
142	Hs 602	リンパ腫、頸
144	JAR	絨毛ガン、胎盤
146	Hs 445	リンパ系、ホジキン病
147	Hs 700T	腺ガン、 骨盤に転移
148	H4	神経膠腫、脳

表 II 続き

ATCC HTB 番号	細胞株	腫瘍のタイプ
151	Hs 696	腺ガン初代、不明、 骨-仙骨に転移
152	Hs 913T	繊維肉腫、肺に転移
153	Hs 729	横紋筋肉腫、左胸
157	FHs 738Lu	肺、正常な胎児
158	FHs 173We	胚全体、正常
160	FHs 738Bl	膀胱、正常な胎児
161	NIH:OVCAR -3	卵巣、腺ガン
163	Hs 67	胸腺、正常
166	RU-ES	ユーイング肉腫
168	ChaGo K-1	気管支原発ガン、 皮下転移、ヒト
169	WERI-Rb-1	網膜芽腫
171	NCI-H446	小細胞ガン、肺
172	NCI-H209	小細胞ガン、肺
173	NCI-H146	小細胞ガン、肺
174	NCI-H441	乳頭状腺ガン、肺
175	NCI-H82	小細胞ガン、肺
176	H9	T細胞リンパ腫
177	NCI-H460	大細胞ガン、肺
178	NCI-H596	腺癌扁平上皮ガン (adenosquamous carcinoma)、肺
179	NCI-H676H	腺ガン、肺
180	NCI-H345	小細胞ガン、肺
181	NCI-H820	乳頭状腺ガン、肺
182	NCI-H520	扁平上皮細胞ガン、肺
183	NCI-H661	大細胞ガン、肺
184	NCI-H510A	小細胞ガン、 肺臓外起源、転移性
185	D283 Med	髄芽腫
186	Dacy	髄芽腫
187	D341 Med	髄芽腫
188	AML-193	急性単球性白血病
189	MV4-11	白血病二重表現型 (leukemia biphenotype)

((a) 抗腫瘍細胞抗体) 腫瘍抗原標的を認識するための容易な手段は、その特定の抗原に対する結合親和性を有する抗体を使用することである。固形腫瘍抗原に対する幅広い数の抗体が公知である。いくつかの有用な抗腫瘍抗体を上記表 I に示している。しかし当業者には直ちに理解されるように、表 I に示す抗体のいくつかは、治療用途に対して適切な生化学的特性を有さないか、十分な腫瘍特異性を有さない可能性がある。その一例は、細胞質抗原を認識する MUC 8-22 である。一般に、これらのような抗体は、モデル系またはスクリーニングアッセイにおけるような研究の実施態様においてのみ有用である。

【0277】一般に、本発明のこれらの局面において使用される抗体は、好ましくは、細胞表面に接近可能な抗原および腫瘍細胞によって優先的にあるいは特異的に発現される抗原を認識する。このような抗体はまた好まし

くは、例えば $K_d < 200 \text{ nM}$ 、好ましくは $< 100 \text{ nM}$ を示す高い親和特性を示し、生命を維持している (life-sustaining) 通常組織、例えば心臓、腎臓、脳、肝臓、骨髄、結腸、胸部、前立腺、甲状腺、胆嚢、肺、副腎、筋肉、神経繊維、脾臓、皮膚、またはその他のヒト身体中の生命を維持している器官または組織から選ばれる一つ以上の組織に対しては、有意な反応性を示さない。本発明の目的において最も重要な「生命を維持している」組織は、低反応性の観点から言えば、心臓、腎臓、中枢神経系および末梢神経系組織および肝臓を含む。本明細書で使用する用語「有意な反応性」とは、免疫組織化学分析に適した条件下において特定の組織に適用された際に、大部分ネガティブな細胞ばかりのフィールド中にはほんの僅かのポジティブな細胞が散りばめられた状態であって染色を引き起こさないあるいは無視可能な程度の染色しか引き起こさないような、

抗体または抗体フラグメントをいう。

【0278】本発明での使用が考えられる表I内の抗体中で可能性が特に高い抗体は、固形腫瘍に高い選択性を有するものである。例えば、多くの乳ガン、肺ガン、および結腸／直腸ガンの表面に選択的に見られるTAG72およびHER-2プロトオンコジーンタンパク質に結合する抗体(Thorら、1986。Colcherら、1987。Shepardら、1991)；MOV18およびOV-TL3ならびに乳ムチンコアタンパク質およびヒト乳脂肪小球体に結合する抗体(Miottiら、1985。Burchellら、1983)；および高M_rメラノーマ抗原に結合する抗体9.2.27(Reisfeldら、1982)である。更に有用な抗体は、ほぼ全ての卵巣ガン腫において均一に発現することが知られている、葉酸結合タンパク質に対する抗体；扁平上皮細胞ガン腫および大多数の神経膠腫において過剰発現されるオンコジーンのerbファミリーに対する抗体；および現行の前臨床評価および臨床評価の対象として知られるその他の抗体である。

【0279】抗体B3、KS1/4、CC49、260F9、XMMCO-791、D612およびSM3は、当該分野で通常実施されている標準的な前臨床試験後の臨床実施態様における使用に特に適切であると思われる。B3(米国特許第5,242,813号；Brinkmanら、1991)は、ATCC受託番号HB10573を有する；KS1/4は米国特許第4,975,369号に記載されるように作製し得る；D612(米国特許第5,183,756号)は、ATCC受託番号HB9796を有する。

【0280】腫瘍関連標的を規定するための別の手段は、腫瘍細胞によって発現された抗原の生化学的特性を記載するのではなく、腫瘍細胞の特性を考慮して説明する。従って、本発明者らは、表IIに挙げた腫瘍細胞に優先的に結合する任意の抗体を、二重特異性リガンドの標的化成分として使用し得ると考える。優先的な腫瘍細胞結合もまた、腫瘍細胞に高親和性を示し、かつ、上記に定義された生命維持している正常細胞または組織に対して有意な反応性を有さない抗体に基づく。

【0281】本発明は従って、本明細書に記載する標的化された凝固方法に使用される抗体を生成するためのいくつかの手段を提供する。腫瘍細胞特異的抗体を生成するためには、腫瘍細胞抗原を含有する組成物を用いて動物を免疫化し、本明細書中以下において詳細に説明するように、得られた抗体のなかで適切な特異性を有するものを選択することになるであろう。免疫化組成物は、表I中の任意の抗原の精製されたあるいは部分的に精製された調製物；表I中の任意の抗原を富化した(enriched)膜調製物(membrane preparation)等の組成物；表II中に挙げた任意の細胞；または、表II中に挙げた任意の細胞タイプを含む

細胞混合物または細胞集団を含有していてもよい。

【0282】もちろん、抗体の供給源に関わらず、ヒト処置における本発明の実施の際には、臨床的に標的化された腫瘍が最終的に選択された抗原を発現することを前もって確実にすることが好ましい。これは、例えば外科的生検のような腫瘍組織サンプルを抗原について試験することまたは恐らくは循環している放出抗原(shed antigen)を試験することを包含する、比較的容易なアッセイによって達成される。これは、腫瘍に対する反応性に関してハイブリドーマの「バンク」由来の抗体の結合親和性を試験するELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)のような免疫学的スクリーニングアッセイにおいて容易に実施し得る。その後、適切な腫瘍選択性および親和性を示す抗体を選択して、本発明の二重特異性抗体の調製のために用いることができる。

【0283】周知の交差反応性現象のため、最初の抗原をヒト細胞から得る免疫化プロトコルに加えて、最初に使用される抗原がマウスや霊長類のような動物由来であるような免疫化プロトコルから有用な抗体が得られ得ることが予想される。ヒト起源の抗原を用いる場合、これらはヒト腫瘍細胞株から得てもよく、または、問題となっている特定の患者からの生体サンプルを得ることによって調製してもよい。実際、患者の腫瘍に対する「特別に誂えた(custom-tailored)」抗体の誘起のための方法は公知であり(Stevensonら、1990)、本発明においての使用が考えられる。

【0284】(b)更なる腫瘍細胞標的および結合リガンド)腫瘍細胞抗原への結合により凝固剤を腫瘍部位に向けるために、抗体の使用に加えて他のリガンドも用いることが可能である。過剰発現されたレセプター(エストロゲンレセプター、EGFレセプター)または変異レセプターである腫瘍抗原に関しては、対応するリガンドを標的化剤として用いることが可能である。

【0285】内皮細胞レセプターリガンドと同様に、特異的または優先的に腫瘍細胞に結合する成分が存在し得る。例えば、腫瘍抗原が過剰発現されたレセプターである場合は、腫瘍細胞をインビボで特異的なリガンドでコートし得る。その後リガンドに対する抗体またはレセプター自体の形態を用いてリガンドを標的化することが可能と思われる。これらのタイプの標的化剤の具体例は、TIE-1またはTIE-2リガンドに対する抗体、第4血小板因子に対する抗体、および白血球接着結合タンパク質である。

【0286】(2.他の疾患標的)更なる実施態様において、第一の結合領域は、腫瘍部位以外の疾患部位において特異的または優先的に発現される標的分子に結合する成分であってもよい。

【0287】他の疾患細胞に関連する標的分子の例は、例えば、乾癬に関連する白血球接着分子；増殖性糖尿病性網膜症に関連するFGF；様々な疾患における活性化

内皮細胞に関連する第4血小板因子；および血管増殖性疾患に関連するVEGFを含む。上記疾患のいずれか一つを有する動物または患者は、疾患部位に凝固を特異的に誘導することによって恩恵を受けられる。

【0288】KlagsburnおよびFolkman (1990)に記載される、通常の血管依存性病因を有することが知られている疾患もまた、本明細書に記載する二重特異性リガンドを用いて処置し得る。特に、血管内皮細胞標的化リガンドまたは間質標的化リガンドを用いて疾患部位における凝固を達成できる。BPH、糖尿病性網膜症、血管再狭窄、血管癒着、AVM、髄膜腫、血管腫、血管新生緑内障、リウマチ性関節炎および乾癬の処置が現在特に考えられる。

【0289】(3. 疾患関連血管系細胞標的) 血管系の細胞は、本発明における標的としての使用が意図される。これらの場合、二重特異性リガンドの1つの結合領域が、疾患関連血管系内皮細胞によって優先的に発現される接近可能マーカーに結合し得る。血管内皮細胞が、疾患領域、および局所的な異常生理プロセスによる産物に近接しているため、血管マーカーの搾取作用が可能となる。例えば、腫瘍血管内皮細胞は、内皮細胞の表現型プロフィールを変化させる、腫瘍細胞および腫瘍由来産物にさらされる。

【0290】腫瘍細胞は、リンホカイン、モノカイン、コロニー刺激因子、成長因子および血管形成誘導因子のような腫瘍由来産物を合成する(elaborate)ことが知られており、これらの腫瘍由来産物は、近隣の血管内皮細胞(Kandelら、1991; Folkman、1985a、b)およびサイトカイン(Burrowsら、1991; Rucoら、1990; Bordenら、1990)に作用する。腫瘍産物は、内皮細胞に結合し、そして特定の分子の発現を選択的に誘導する。これらの誘導された分子が、本発明の特定の局面によって提供される腫瘍内皮特異性コアギュラント送達を用いて標的化され得る。腫瘍内の血管内皮細胞は、多様な正常組織内の内皮細胞より30倍速い速度で増殖し(Denekampら、1982)、このことは増殖関連決定基が、腫瘍血管内皮細胞のマーカーとして作用し得ることを示唆している。

【0291】本発明の特定の実施態様において、二重特異性リガンドの標的化成分は、腫瘍血管系に対して比較的高い特異性を有する成分である。これらの標的化成分は、腫瘍内皮において発現される分子と結合するが、正常内皮細胞の表面においては、ほとんどまたは全く発現のない成分として定義され得る。このような特異性は、当業者にとっては慣例である、組織切片の免疫染色の標準的な手順によって評価され得る。

【0292】しかし、上述したように、本発明の利得は、選択性の要求が、先行技術の方法、特にイムノトキシンを用いる方法において以前必要とされていたほど厳

密ではない点にある。これはなぜなら、凝固剤の誤った標的化に伴ういかなる副作用も、トキシンの誤った標的化から生じる副作用と比較すると最小となるからである。

【0293】従って、本発明の二重特異性リガンドまたは抗体を用いて標的化される分子は、腫瘍血管系上において、正常内皮細胞よりも高いレベルにて発現される分子と一般的に提唱される。

【0294】(a) 疾患における血管内皮細胞マーカー) 疾患部位または疾患環境内の血管内皮細胞の表面において優先的に発現することが知られている分子は、本明細書中において、「自然疾患関連血管内皮細胞マーカー」と称される。この用語は、増加した、または不適切な脈管形成または内皮細胞の増殖に関連した疾患において発現される内皮細胞成分を、簡潔にいうために用いられる。1つの特定の例として、腫瘍由来因子に応答してインサイチュで発現される腫瘍内皮細胞成分が挙げられる。これらの成分はまた、「自然誘導腫瘍内皮細胞マーカー」とも称される。

【0295】VEGF/VPF(血管内皮増殖因子/血管透過性因子)、およびFGF(線維芽細胞成長因子)ファミリーの構成要素の両方が、腫瘍血管系内または腫瘍血管系上において濃縮される。従って、対応するレセプターは、腫瘍血管系上に潜在的な攻撃の標的を提供する。例えば、VEGFレセプターは、齧歯類およびヒトの両方において、正常組織内の内皮細胞と対照的に、腫瘍内皮細胞上においてアップレギュレートされることが知られている(Thiemeら、1995)。おそらく、これは腫瘍微環境の特徴である低酸素の結果である(Leithら、1992)。FGFレセプターはまた、低酸素にさらされた内皮細胞上において3倍アップレギュレートされ、それゆえ腫瘍においてアップレギュレートされと考えられている(BicknellおよびHarrisら、1992)。

【0296】内皮細胞上のTGF β (トランスフォーミング成長因子 β)レセプター(エンドグリン)は、分裂細胞上でアップレギュレートされ、他の標的を提供する。本発明者の一人は、エンドグリンが、培養中の、活性化されて分裂しているHUVECにおいてアップレギュレートされ、そして広範囲の固形腫瘍および胎盤胎児部を含む、血管新生の部位における内皮細胞上でヒト組織において強く発現されることを見いだした。対照的に、前新生物病巣を含む、多様な非悪性成人組織の大半における内皮細胞は、ほとんどまたは全くエンドグリンを含有しない。重要なことに、エンドグリン発現は、TEC-4およびTEC-11抗体が低いレベルで良性線維腺種および初期のガンに結合すること、ならびにこれらの抗体が高いレベルで後期腺管内ガンおよび浸潤ガンに結合することにより示されるように、胸部における新生物進行と相関すると考えられている。

【0297】他の自然疾患関連血管内皮細胞マーカーは、TIE、VCAM-1、P-セレクトリン、E-セレクトリン、 $\alpha_v \beta_3$ インテグリン、プレイオトロピンおよびエンドシアリンを含み、それぞれが本発明を用いて標的化され得る。

【0298】((b) サイトカイン誘導性血管内皮マーカー) しばしば身体における局所的な機能不全を起こす疾患プロセスの性質により、他の組織に比較的影響することなく、疾患部位を操作する方法が利用可能である。これは、動物の身体内において別個の物として存在する悪性および良性腫瘍に特に当てはまる。例えば、腫瘍血管内皮細胞に特異的なさらなるマーカーをつくるように、腫瘍環境を操作し得る。これらの方法は、概して固形腫瘍において自然に生じる腫瘍環境を模倣し、また、近接する血管内皮細胞の表面において特定の分子の特異的発現を誘導する、成長因子またはサイトカインのようなシグナル因子の局所的な産生を伴う。

【0299】疾患または腫瘍環境における血管内皮細胞の表面において発現するように人工的に誘導され得る分子群は、本明細書において「誘導性内皮細胞マーカー」、または特定のには誘導性腫瘍内皮細胞マーカーと称される。この用語は、動物内の疾患または腫瘍発達プロセスの一部として誘導されるマーカーではなく、人工的に誘導される、つまり人の手による操作の結果誘導されるマーカーを指すのに用いられる。上記定義された用語「誘導性マーカー」を、「自然マーカー」も例えば腫瘍由来因子によって誘導されるという事実にも関わらず、本出願における簡潔な表記のために選択した。

【0300】従って、本発明を実施するためには必要ではないが、疾患関連血管系の表面上の血管内皮抗原標的の選択的誘起のための技法が利用可能であり、これは、所望であれば本発明と併用して用いられ得る。これらの技法は、抗原発現、すなわち細胞表面提示を操作して、標的抗原が、疾患関連血管系の表面において発現または利用可能にされるが、正常内皮の表面上では発現されない、あるいは接近可能または結合のために利用可能にされない、または少なくともより少ない程度にされるよう

にする。

【0301】腫瘍内皮マーカーは、腫瘍由来サイトカイン(Burrowsら、1991; Rucioら、1990)および血管形成誘導因子(Mignattiら、1991)によって誘導され得る。本発明によって提供される、腫瘍内皮において特異的に誘導され得、次いで二重特異性凝固リガンドを用いて標的化され得る細胞表面マーカーの例には、表IIIに示されるものが含まれる(Bevilacquaら、1987; Dustinら、1986; Osbornら、1989; Collinsら、1984)。

【0302】提案されるマーカーの誘導のメカニズム; IL-1およびIFN- γ のような誘導、すなわち「中間サイトカイン」; ならびに、その標的化によってサイトカインの放出が生じる白血球細胞タイプおよび関連するサイトカイン活性分子もまた、表IIIに示されている。特異的なマーカーの誘導の際には、二重特異性「サイトカイン誘導」または、「抗原誘導」抗体が通常必要とされる。この抗体は、腫瘍の場所における適切なサイトカインの放出を選択的に誘導し、従って、血管内皮細胞による、所望の標的抗原の発現を選択的に誘導する。二重特異性抗体は、腫瘍塊およびサイトカイン産生白血球の細胞を架橋し、その結果白血球を活性化し、サイトカインを放出する。

【0303】これらのような、二重特異性抗体の調製および使用は、CD3、CD14、CD16およびCD28を認識する架橋抗体が、第2抗原と架橋して、サイトカイン産生を選択的に誘起するという先に示された事実に基づいている(Qianら、1991)。本発明においては、首尾良く腫瘍細胞架橋された白血球のみが活性化され、サイトカインを放出するので、サイトカイン放出は、腫瘍の場所に限定される。従って、E-セレクトリンのような所望のマーカーの発現も同様に、腫瘍血管系の内皮に限定される。

【0304】

【表3】

表 III
可能な誘導性血管標的

誘導性内皮細胞分子	頭文字	サブタイプ/別名 (分子ファミリー)	誘導サイトカイン	これらのサイトカイン を産生する白血球	モノクローナル抗体によって架橋され ると、サイトカインを産生するように 細胞を活性化する白血球分子
内皮白血球接着分子-1	ELAM-1 E-セレクトリン	(セレクトリン)	IL-1, TNF- α , (TNF- β) (細菌エンドトキシン)	単球	CD14
				マクロファージ	CD14
				肥満細胞	IgEに対するFcR
血管細胞接着分子-1	VCAM-1	誘導性細胞接着分子-110 (ICAM-110) (免疫グロブリンファミリー)	(細菌エンドトキシン) IL-1, TNF- α	単球	CD14
				マクロファージ	CD14
			TNF- β , IL-4	ヘルパーT細胞	CD2, CD3, CD28
			TNF	NK細胞	IgG(CD16)に対するFcR

表 I I I 続 き

誘導性内皮細胞分子	頭文字	サブタイプ/別名 (分子ファミリー)	誘導サイトカイン	これらのサイトカイン を産生する白血球	モノクローナル抗体によって架橋され ると、サイトカインを産生するように細胞を 活性化する白血球分子
細胞内接着分子-1	ICAM-1	.. (免疫グロブリンファミリー)	IL-1, TNF α , (細菌エンドトキシン)	単球	CD14
				マクロファージ	CD15
			TNF- β , IFN γ	肥満細胞	IgEに対するFcR
				Tヘルパー細胞	CD2, CD3, CD28
白血球接着分子-1に 対する因子	LAM-1因子	MEL-14 因子 (マウス)	IL-1, TNF α (細菌エンドトキシン)	NK細胞	IgG(CD15)に対するFcR
				単球	CD14
				マクロファージ	CD14
				肥満細胞	IgEに対するFcR
主要組織適合性複合体 クラスII抗原	MHCクラス II	HLA-DR	IFN- γ	ヘルパー-T細胞	CD2, CD3, CD28
		HLA-DP			
		HLA-DQ			
		I-A			
		I-E		NK細胞	IgG(CD15)に対するFcR

表 I I I に示される可能な誘導性マーカーの内、E-セレクトリンおよびHLA-DR、HLA-DPおよびHLA-DQのようなMHCクラスII抗原 (Cottraneら、1984) が、臨床実施態様と合わせて使用される断然最も好ましい標的であることに留意することが重要である。表 I I I の他の接着分子は、正常組織、通常はリンパ器官内および内皮上において、変化する程度に発現し、このことはこれらの標的化をおそらく、動物モデルにおいて、または正常組織におけるそれらの発現が有意な副作用なしに阻害され得る場合にのみに適切にしている。E-セレクトリンまたはMHCクラスII抗原の標的化が好ましい。なぜなら、これらの抗原の発現が、腫瘍結合内皮において選択的に最も直接的に促進しそうであるからである。

【0305】(E-セレクトリン) 正常内皮の表面において発現されない抗原の標的化は、誘導法の最も率直な形態である。E-セレクトリンは、正常内皮血管系、または他のヒト細胞タイプにおいて発現されない接着分子であるが (Cottraneら、1986)、IL-1、TNF、リンボトキシンおよび細菌エンドトキシンのようなサイトカインの作用によって、内皮細胞の表面上に誘導され得る (Bevilacquaら、1987)。これは、IFN- γ によっては誘導されない (Wuら、1990)。従って、E-セレクトリンの発現は、そのようなサイトカインの選択的な送達を介して、または腫瘍環境においてそのようなサイトカインの選択的な放出を生じる組成物の使用を介して、腫瘍内皮中に選択的に誘導され得る。

【0306】二重特異性抗体は、腫瘍部位において、1つ以上の上記またはその他の適切なサイトカインの選択的な放出を生じ得るが、身体その他の部分において放出を生じ得ない組成物の一例である。そのような二重特異性抗体は、本明細書において、「抗原誘導抗体」と称され、当然、標的化および凝固成分を有する、本発明の任意の二重特異性抗体とは異なる。抗原誘導抗体は、単球/マクロファージ系列 (lineage)、T細胞、

および/またはNK細胞、あるいは肥満細胞のようなサイトカインエフェクター細胞と、標的化された固形腫瘍塊の腫瘍細胞とを架橋するように設計される。次いで、この架橋は、架橋の部位、すなわち腫瘍に局在化されたサイトカインの放出をもたらす。

【0307】有効な抗原誘導抗体は、一方で選択された腫瘍細胞表面抗原 (例えば、表 I における腫瘍細胞表面抗原) を認識し、他方で選択された白血球細胞タイプの表面上の選択された「サイトカイン活性化」抗原を認識する。「サイトカイン活性化」抗原という用語は、抗体またはそのフラグメント、もしくは自然に生じる因子またはその合成アナログのようなエフェクター分子によって結合されると、それが可溶性因子であっても他の細胞上の膜結合カウンターレセプターであっても、白血球細胞によってサイトカインの放出を促進する白血球の表面上の種々の既知の分子のいずれをも指すために用いられる。サイトカイン活性化分子の例にはそれぞれ、IL-1およびTNF α の放出を活性化するCD14 (LPSレセプター) およびIgEに対するFcR; ならびにIFN γ およびTNF β の放出を活性化するCD16、CD2、またはCD3、または、CD28が含まれる。

【0308】そのような抗原誘導二重特異性抗体は、いったん腫瘍を有する動物の血流に導入されると、腫瘍内の腫瘍細胞に結合し、それらの腫瘍細胞を、腫瘍に浸潤したエフェクター細胞 (例えば単球/マクロファージ) と架橋し、その後、腫瘍内のサイトカインの選択的な放出をもたらす。しかし、重要なことに、腫瘍および白血球の架橋なしに、抗原誘導抗体は、サイトカインの放出をもたらさない。従って、腫瘍から離れた身体の部分において、サイトカイン放出は生じないため、サイトカイン誘導分子 (例えば、E-セレクトリン) の発現は、腫瘍内皮内のみを生じる。

【0309】適切な二重特異性抗体と架橋されると、架橋された白血球によってサイトカインの放出を生じる、多数の有用な「サイトカイン活性化」抗原が知られている。この目的のために通常好ましい標的は、単球および

マクロファージの表面において見いだされるCD14である。CD14は架橋されると、単球／マクロファージを刺激し、IL-1 (Schuttら、1988; Chenら、1990)、およびおそらく他のサイトカインを放出し、これらは次いで、近接する血管系上のE-セレクトインの出現を刺激する。E-セレクトイン誘導および標的化に関連した他の可能な架橋の標的には、肥満細胞上に見いだされるIgEに対するFcR; NK細胞上に見いだされるIgG (CD16) に対するFcR; およびT細胞の表面上に見いだされるCD2、CD3またはCD28が含まれる。他の白血球細胞タイプよりも、固形腫瘍の単球／マクロファージ浸潤が相対的に分布するため、これらの内、CD14標的化が通常望ましい。

【0310】誘導実施態様の例において、固形腫瘍を有している動物に、二重特異性 (Fab'-Fab') 抗CD14／抗腫瘍抗体 (例えば、高Mrメラノーマ抗原OV-TL3に対する抗-CEA、9.2.27抗体、または卵巣関連抗原に対するMOv-18抗体) を注射する。抗体は、その腫瘍結合活性によって、腫瘍内に局在化し、次いで、腫瘍内の単球およびマクロファージを、それらのCD14抗原を架橋することによって活性化する (Schuttら、1988; Chenら、1990)。活性化された単球／マクロファージは、抗腫瘍性活性を有し (Palleroniら、1991)、そして腫瘍血管内皮細胞上のE-セレクトイン抗原をすばやく誘導するIL-1およびTNFを放出する (Bevilacquaら、1987; Poberら、1991)。

【0311】(MHCクラスII抗原) 本発明における使用が考えられる誘導性マーカーの第2の好ましいグループは、HLA-DA、HLA-DPおよびHLA-DQを含むMHCクラスII抗原 (Collinsら、1984) である。クラスII抗原は、ヒトを含む数種類の種のほとんどの正常な組織内の血管内皮細胞上で発現される。インビトロ (Collinsら、1984; Daarら、1984; O'Connellら、1990) およびインビボ (Groenewegenら、1985) での研究により、血管内皮細胞によるクラスII抗原の発現には、 T_H1 細胞によって形成され、そしてNK細胞およびCD8⁺ T細胞によってもより低い程度に形成されるIFN- γ の継続した存在が要求されることが示されている。

【0312】MHCクラスII抗原は血管内皮細胞に特有のものでなく、マウス (Hammerling、1976) およびヒト (Daarら、1984) の双方において、B細胞、活性化されたT細胞、単球／マクロファージ系統の細胞、およびある種の上皮細胞上においても構成的 (constitutively) に発現する。「正常な」内皮上でのMHCクラスII抗原の発現のため、それらの標的化はE-セレクトインほどには簡単では

ない。しかし、正常な組織内でのクラスII分子の発現を効果的に抑制する能力を有するシクロスポリンA (Cyclosporin A; CsA) など (Groenewegenら、1985) の免疫抑制剤と関連して使用することによって、MHCクラスII抗原の誘導および標的化が可能となる。CsAは、T細胞およびNK細胞の活性化を防止することによって作用し (Groenewegenら、1985; DeFranco、1991)、それによってIFN- γ の基底レベル (basal level) を内皮上におけるクラスIIの発現を維持するのに必要とされるレベル以下に減少させる。

【0313】やはり免疫抑制効果を有し、クラスII発現を抑制する能力を示すと思われる、シクロスポリンA、B、C、D、Gなどを含む、CsAに関連するその他の種類のシクロスポリンが存在する。同様に有効であり得るその他の作用剤には、FK506およびラパマイシン (rapamycin) が含まれる。

【0314】従って、MHCクラスII誘導および標的化の実施態様の実施では、腫瘍を有する動物を、クラスII発現を抑制するために効果的な用量のCsAまたは他のクラスII免疫抑制剤で事前に処置することが必要である。これはCsAの場合、代表的には約10から約30 mg/kg体重のオーダーである。正常組織内で一旦抑制されると、クラスII抗原は、ここでも二重特異性抗体の使用を通じて、腫瘍の内皮内に選択的に誘導され得る。

【0315】この場合、抗原を誘導する二重特異性抗体は、腫瘍細胞マーカーと、IFN- γ の生成を誘導することのできるエフェクター細胞の表面上に見られる活性化抗原とに対する特異性を有する。そのようなエフェクター細胞とは、一般的にはヘルパーT細胞 (T_H) またはナチュラルキラー (NK) 細胞である。これらの実施態様では、クラスII抗原の発現がIFN- γ を用いて達成され、他のサイトカインでは達成されないという点で、T細胞またはNK細胞 (CD16が使用される場合) が腫瘍中に存在し、サイトカイン中間体を生成する必要がある。従って、本発明のこの局面の実施のためには、抗原を誘導する二重特異性抗体による標的化のためのサイトカイン活性化抗原としてCD2、CD3、CD28、最も好ましくはCD28、を選択することが望ましい。

【0316】腫瘍中で活性化されるべきT細胞は、血管系に隣接するものである。細胞にとって最もアクセスし得る領域であり、二重特異性抗体が最も集中するところでもあるからである。活性化されたT細胞は、その後、IFN- γ を分泌し、これが隣接する腫瘍血管系上にクラスII抗原を誘導する。

【0317】一方のアームが腫瘍抗原に対して向けられており、もう一方のアームがCD28に対して向けられている二重特異性 (Fab'-Fab') 抗体の使用

が、現状では好ましい。この抗体は、腫瘍中でT細胞上のCD28抗原を架橋し、これは、(例えば、一般に腫瘍細胞によって分泌されるIL-1によって提供される(Burrowsら、1991; Rucioら、1990))第2の信号と組合わさった場合、T細胞をCA²⁺-非依存性CSA-非抑制性の経路を通じて活性化することが示されている(Hessら、1991; Juneら、1987; Bjorndahlら、1989)。

【0318】種々のサイトカイン活性化分子に対する抗体の調製も、当該分野で周知である。例えば、白血球による、サイトカイン生成を誘導する能力を有する抗-CD14および抗-CD28モノクローナル抗体の調製および使用は、今ではいくつかの研究室によって記述されている(Schuttら、1988; Chenら、1990; およびJuneら、1990で、それぞれ概説されている)。さらに、その他のメカニズムおよびその他の活性化抗原を通じて白血球によるサイトカインの放出を刺激するモノクローナル抗体の調製もまた、公知である(Clarkら、1986; Geppertら、1990)。

【0319】さらなる実施態様では、クラスII分子の発現を抑制し、そして腫瘍が存在する部分でのクラスII分子の発現を選択的に引き出すための別のアプローチが、意図される。CSAおよび二重特異性活性化抗体の双方の使用を回避するこのアプローチは、T細胞によるIFN- γ の生成を抑制すること(例えば抗-CD4抗体の使用を通じて(Streetら、1989))によって、クラスII分子の発現が効果的に阻害され得るという事実を利用する。この実施態様の使用において、IFN- γ の生成は抗-CD4を投与することによって阻害され、結果的にクラスII発現の一般的な抑制となる。クラスIIは、その後、例えば腫瘍内部においてのみ活性化可能である腫瘍特異的T細胞の使用により、腫瘍サイトにおいてのみ誘導される。

【0320】この処置モードにおいては、一般的には動物またはヒトの患者をIFN- γ の生成を抑制するために効果的な用量の抗-CD4によって事前に処置し、それによってクラスII分子の発現を抑制する。効果的な用量は、例えば、約4〜約10mg/kg体重のオーダーである。クラスII発現が抑制された後は、腫瘍細胞の表面上に発現される抗原に対して特異的な、INF- γ を生成するT細胞クローン(例えば、T_H1または細胞毒性のTリンパ球、CTL)が調製され、血流内へ導入される。これらのT細胞はそれらの抗原認識能力のため腫瘍塊に局在化され、そのような認識が行われる際にIFN- γ を放出する。このように、サイトカインの放出はここでも腫瘍に対してのみ制限されて、従って、クラスII分子の発現を腫瘍血管系に限定する。

【0321】IFN- γ を生成するT細胞クローンは、

末梢の血液から入手し得るが(Mazzocchiら、1990)、好ましいソースは腫瘍塊の中からである(Foxら、1990)。そのようなT細胞クローンの現行での好ましい調製手段では、患者から腫瘍塊の一部分を取り除き;(必要に応じてコラゲナーゼ消化を用いて)細胞を分離し;密度勾配遠心分離を用いて腫瘍に浸透する白血球を濃縮し、続いて、(例えば特異性抗体と補体とによる処置によって)その他の白血球の部分集合を枯渇させ;その後、腫瘍に浸透する白血球をインビトロで拡大(expand)させて、IFN- γ を生成するクローンを供給する。このクローンは、必然的に、患者と免疫学的に適合し、従って、患者によって十分に許容される。

【0322】各個別のクローンのサイトカイン分泌パターンを14日毎に決定することによって、高IFN- γ 生成T細胞クローンを、拡大させた白血球からさらに選択し、そのことによって格別の利益を達成することができると提案されている。この目的のため、静止したクローンは有糸分裂的または抗原的に24時間刺激され、それらの培養上澄液は、例えば、特異的サンドイッチELISA技術(Cherwinskiら、1989)を使用して、IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-5およびIL-10の存在についてアッセイされる。T_H1クローンの特徴的なサイトカイン分泌パターンである、高レベルのIL-2およびIFN- γ を分泌するクローンが選択される。腫瘍特異性は、増殖アッセイを用いて確認される。

【0323】さらに、抗-CD4抗体として、抗-CD4 Fabを採用することが好ましい。その理由は、この抗体は注入後24時間以内に身体から除去され、従って後で投与される腫瘍認識T細胞クローンの抑制を生じさせないからである。腫瘍特異性を有するT細胞クローンの調製は、一般に当該分野で周知であり、例えば固形の黒色腫に浸透するリンパ球からのT細胞クローンの生成および特徴付けによって示される(Maedaら、1991)。

【0324】MHCクラスII抑制-誘導法のいずれを使用するにしても、静脈注射される抗-クラスII抗体が、外皮細胞または肝臓および脾臓以外の正常な臓器内の単球/マクロファージに達するようには見えないという事実より、結果的に更なる利益が得られそうである。これは、おそらく、ほとんどの正常な臓器内の血管内皮は、肝臓および脾臓内でのように有窓性を有さずタイトであり、従って抗体はクラスII-陽性細胞に達するために基底膜を横切って拡散せねばならないからである。また、例えば架橋に続いて、結果として生じ得るいかなるB細胞除去も、これらの細胞がクラスII陰性の先祖細胞から補充されるので、重要な問題を提示しそうにない(Loweら、1986)。Bリンパ腫の患者に起こるB細胞の殺傷さえも、明らかな害を生じるものではな

い (Vitettaら、1991)。

【0325】要約すると、本発明の腫瘍凝固組成物および抗体はすっきりとシンプルであり、それらの操作性に関して抗原の誘導を必要としないが、抗原を誘導する二重特異性抗体の、本発明と組み合わせた使用も意図されている。そのような抗体は一般的に、本発明の二重特異性凝固リガンドに先立って、投与される。

【0326】一般的に言って、「免疫原性」の腫瘍であるほど、例えば腫瘍内のT細胞の抗-CD28/抗-腫瘍二重特異性抗体を通じての架橋を含む、MHCクラスIIアプローチにより適している。その理由は、これらの腫瘍はT細胞によってより浸透されやすいからであり、このことはこの方法が有効であるための前提条件だからである。免疫原性固形腫瘍の例として、腎臓ガン腫、黒色腫、少数の乳ガンおよび結腸ガンの他に、可能性のあるものとして膵臓ガン、胃ガン、肝臓ガン、肺ガンおよび神経膠ガンが含まれる。これらの腫瘍は、「免疫原性」として言及される。それは、これらが宿主中で免疫反応を引き起こす証拠が在り、細胞免疫療法を施せることが判明しているからである (Yamaueら、1990)。黒色腫および大腸ガンの場合、これらの事例での使用が最も好ましい抗体は、B72.3 (抗-TAG-72) およびPRSC5/PR4C2 (抗-Lewis a) または9.2.27 (抗-高 Mr 黒色腫抗原) である。

【0327】全ての起源の固形腫瘍の多数について、マクロファージ/単球中間体を採用する抗-CD14アプローチがより適切である。これは、ほとんどの腫瘍はマクロファージを豊富に含んでいるからである。マクロファージを豊富に含む腫瘍の例として、ほとんどの乳ガン腫、結腸ガン腫および肺ガン腫が含まれる。これらの事例での使用が好ましい抗-腫瘍抗体の例として、抗-HER-2、B72.3、SM-3、HMFG-2、およびSWA11がある (Smithら、1989)。

【0328】((c) コアギュラント誘導性マーカー)

トロンビン、第IX/Xa因子、第X/Xa因子、プラスミンおよび、間質性コラゲナーゼ、ストロメリシンおよびゼラチナーゼなどの金属結合タンパク分解酵素などのコアギュラントは、ある種のマーカーを誘導するようにも作用する。特に、E-セレクトイン、P-セレクトイン、PDGFおよびICAM-1は、トロンビンによって誘導される (Sugamara、1992; Shankarら、1994)。

【0329】従って、この誘導については、抗-コアギュラント/抗-腫瘍二重特異性抗体が利用される。抗体は、その腫瘍結合活性によって腫瘍内に局在化される。その後、二重特異性体はコアギュラント (例えばトロンビン) を腫瘍内に濃縮し、結果的に腫瘍血管内皮細胞上でのE-セレクトインおよびP-セレクトインの誘導が得られる (Sugamara、1991; Shankarら、1994)。

【0330】あるいは、短縮型組織因子の腫瘍細胞または内皮への標的化が、腫瘍内でのトロンビンの堆積を誘導する。トロンビンが堆積されると、腫瘍血管内皮細胞上にE-セレクトインおよびP-セレクトインが誘導される。

【0331】((d) 血管内皮細胞マーカーに対する抗体) 疾患関連血管系標的を認識するための直載的な手段は、自然環境においてまたは人工的な手段によって誘導されたものに関係なく、特定の細胞表面レセプター、分子または抗原に対して結合親和力を有する抗体を使用する。これらは、例えば腫瘍血管内皮細胞上に存在することが知られているもの、腫瘍に由来する因子に反応して誘導あるいは過剰発現されるもの、およびヒトの手による操作に従って誘導されるものである、全ての細胞表面成分に対する抗体を含む。表IVおよび表Vに、有用な抗体およびそれらの特性を要約する。

【0332】

【表4】

TABLE IV
ヒト腫瘍血管系に対するある種の抗体の血管系染色パターンの要約

抗体	抗原	参照	染色された腫瘍タイプのパーセント	染色された腫瘍血管のパーセント	正常血管の反応度
抗-vWF	VIII R Ag		100	100	全てに強い強
FB5	エンドシアリン	Rettig & old	30	10-20	リンパ系臓器
TP3	80 kDa 骨肉腫関連抗原タンパク質	Bruland	50	10-30	小BVで強
HC-1	フィブネクチン イソ型	Zardi	60	10-30	無し
TV-1	フィブネクチン	Epstein	100	100	全てに強い強
LM 609	$\alpha_v\beta_3$ ビトロネクチンレセプター	Cheneoh	85	70-80	全てについて中間
TEC 11	エンドグリン	Thorpe;	100	100	ほとんどに強い弱
TEC 110	VEGF	Thorpe;	100	100	ほとんどに強い弱

【0333】

【表5】

TABLE V
ヒト腫瘍での抗-EC mAbs の比較

腫瘍タイプ	n	TEC 110	TEC 11	FB-5	TP-3	BC-1	TV-1	LM 609
消化器系								
胃腸	9	++	++	+-	++	+	++	++
肝臓	3	++	++	-	++(小)	-	ND	ND
生殖系								
乳房	1	+	++	-	ND	++	++	-
卵巣	4	++	++	-	++(小)	++	++	+
子宮	2	++	++	-		++	++	+
呼吸器系								
肺	3	++	++	+	ND	++	++	+
リンパ系								
ホジキン	2	++	++	-	+	-	++	+

本発明で使用し得るさらなる2種類の抗体は、Rettigら(1992)およびWangら(1993)によって記載された、ヒトの腫瘍の血管系内に発現されるがほとんどの正常な組織内では発現されない、未知の機能を有する関連のない抗原に対する抗体である。

【0334】Kimら(1993)によって記載された抗体も、特にこの抗体がインビボで血管形成を阻害し腫瘍の成長を抑制したので、本発明で使用し得る。

【0335】ヒトの腫瘍について特異的であることが以前に示されていない抗体も使用し得る。例えば、Venkateswaranら(1992)は、抗-FGF MAbsの生成を記載した。Xuら(1992)は、FGFレセプター(flg)イソ型に対する、16個のイソ型およびドメイン特異的ポリクローナルおよびモノクローナル抗体のパネルの開発および特徴付けを行った。Massogliaら(1987)も、FGFに対するMAbsを報告した。

【0336】((e)疾患血管系に対する抗体の生成) 上記の抗体および科学文献において公知で公表されているその他の抗体など、既知の抗体を利用することに加えて、以下により詳細に説明されるように、通常の免疫化手順を使用することによっても新規な抗体を生成し得る。周知の疾患関連血管マーカー抗原に対する抗体を生成するために、抗原を含む免疫原性組成物によって動物を免疫化する。これは、抗原を含む、あるいは抗原が濃縮された膜調製物；細胞または膜から分離されたような抗原の比較的精製された形態；例えば、天然の抗原抽出物または組換え宿主細胞から得られた抗原の組換型の形態を用いる、種々の精製工程によって得られるような、抗原の高度に精製された形態であり得る。

【0337】本発明は、疾患関連血管系内皮細胞上に存在する抗原に対する抗体を生成するための更なる方法をも提供し、それらの方法は抗原の生化学的本質が未知である場合であっても使用に適切である。これらの方法は、腫瘍血管系内皮細胞に対する抗体の生成を通じて例

示される。この様式により抗体の生成を達成する第1の手段には、動物またはヒトの患者の腫瘍部位から得られる血管内皮細胞の調製物が用いられる。そのような細胞の調製物で単に実験動物を免疫化することにより、生成される抗体を回収する。この方法の最も有効な形態は、特異的抗体がついで選択されるが、これは従来のハイブリドーマ技術および腫瘍血管系内皮細胞に対するスクリーニングを使用することにより達成され得る。

【0338】上記方法の発展は、インビトロで腫瘍血管系事象を模倣するものであり、細胞の精製は必要ではない。この方法の使用では、内皮細胞を、動物中よりもむしろ細胞培養中の腫瘍馴化培地から得られ得るような、腫瘍に由来する生成物にさらす。この方法は、一般的に内皮細胞を腫瘍馴化培地で刺激すること、および刺激された内皮細胞を免疫原として適用し、抗体の収集物を調製することを包含する。ここでも、特異的抗体が選択されるが、それは例えば従来のモノクローナル抗体技術、または免疫化し動物の脾臓から単離されたRNAから調製された組み合わせた免疫グロブリンフェージミドライブラリなどのその他の技術を用いる。腫瘍に刺激された血管内皮を優先的に認識し、正常なヒト成人の組織とよりも腫瘍関連内皮細胞とより強く反応する特異的抗体が選択される。

【0339】この点に関して使用を意図される刺激された内皮細胞は、例えば、ヒト臍静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cells; HUVE)、ヒト皮膚細血管内皮細胞(human dermal microvascular endothelial cells; HDEMC)、ヒト伏在静脈内皮細胞(human saphenous vein endothelial cells)、ヒト大網脂肪内皮細胞(human omental fat endothelial cells)、その他のヒト細血管内皮細胞、ヒト脳の毛細管内皮細胞などである。本願明細書の記述に従い、他種

からの内皮細胞が、腫瘍馴化培地によって刺激され得、免疫抗原として用いられてハイブリドーマを生成し抗体を生産することも意図される。すなわち腫瘍で刺激されたヒトの血管内皮細胞と交差反応する抗体、および／または前臨床モデルで使用する抗体を生成することも、意図される。

【0340】本明細書において、「腫瘍馴化培地」は、ひとつまたはそれ以上の腫瘍に由来するサイトカイン、リンフォカインまたはその他のエフェクター分子を含有する培養培地のような組成物または培地として定義される。最も典型的には、腫瘍馴化培地は、選択された腫瘍細胞が培養され、従ってそのような腫瘍に由来する生成物が濃縮される培養培地から調製される。培地のタイプは、少なくとも初期の時点で腫瘍細胞の増殖を維持するのに適切な養分と条件とを含有する限り、特に重要とは考えられない。腫瘍馴化培地から物質を抽出しさらには分離し、ひとつまたはそれ以上の抽出物を内皮細胞に適用することも、もちろん可能である。

【0341】培地の調製のために使用される腫瘍のタイプに関しては、究極的に本発明を使用する分析または処置を受ける腫瘍を模倣するまたはそれに類似する腫瘍を採用することがもちろん好ましい。従って、例えば、乳ガンの治療のためのプロトコルの開発を予測する場合、ZR-75-1、T47D、SKBR3、MDA-MB-231などの乳ガン細胞を採用することが好ましい。結直腸腫瘍の場合、HT29ガン腫と同様DLD-1、HCT116若しくはSW48またはSW122が、例として言及され得る。肺腫瘍の場合、NCI-H69、SW2、NCI-H23、NCI-H460、NCI-H69、またはNCI-H82が、例として言及され得る。黒色腫の場合の良い例は、DX-3、A375、SKMEL-23、HMB-2、MJM、T8または実際にVUPである。上記のいかなる場合も、処置されるべき腫瘍から生成された細胞、すなわち生検から得られた細胞も採用され得ることが更に考えられる。

【0342】一旦調製されると、腫瘍馴化培地は、ついで内皮細胞の細胞表面上の腫瘍内皮細胞特異的マーカーの出現を刺激するために用いられる。例えば、選択された内皮細胞を腫瘍馴化培地（またはそれに由来する生成物）の存在下で培養することを含む。ここでも、採用される内皮細胞のタイプは、それが最終的に治療または診断されるべき特定の腫瘍の血管系に関連する内皮細胞を一般的に代表する限り、決定的に重要でないことが提案される。ヒト臍静脈内皮細胞（HUV E）またはヒト皮膚細血管内皮細胞（HDMEC、Karasek、1989）を適用することが好ましい。なぜならヒトにその起源を有し、サイトカイン成長因子および血管形成因子に反応し、容易に得られるからである。しかし、インビトロで培養し得るいかなる内皮細胞も本発明の実施において採用され得、やはり有益な結果を達成し得ることが

期待されている。EA.hy9.26、ECV304、ヒトの伏在静脈内皮細胞などが、例として言及され得る。

【0343】一旦、腫瘍に由来する生成物を用いて刺激されると、内皮細胞はその後、モノクローナル抗体（MAb）の調製の免疫原として適用される。抗原細胞表面マーカーに対するMAbを調製する技術はまったく明確であり、当業者に周知の技術を使用することにより容易に実施され得る。これは、KohlerおよびMilstein（1975）の手順によって例示され、以下で更に説明される。

【0344】一般的に言って、刺激された内皮細胞を使用してMAbを調製する好ましい方法は、以下の手順を包含する。ヒト腫瘍由来の細胞または細胞株が、組織培養で4日間またはそれ以上増殖される。組織培養上澄液（「腫瘍馴化培地」）を腫瘍細胞培養液から取り出し、HUVECの培養液へ50%（v/v）の最終濃度となるように加える。2日間の培養の後、HUVECは非酵素的に回収され、 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個の細胞がマウスの腹腔内に注入される。このプロセスを、2週間の間隔をおいて3回繰り返す、最終の免疫化は静脈ルートによる。3日後、脾臓細胞を採取し、通常のプロトコル（KohlerおよびMilstein、1975）に従ってSP2/O骨髓腫細胞と融合し、適切な反応性を有する抗体を生成するハイブリドーマを限界希釈法によってクローン化する。

【0345】結果として生じるハイブリドーマのコレクションから、活性化されていない血管内皮を認識する以上に活性化された血管内皮を認識する抗体を生成する、ひとつまたはそれ以上のハイブリドーマを選択する。ひとつのゴールは、正常な内皮に対する結合親和力を実質的に有しない抗体の同定である。しかし、先行技術と比較した際、本発明においてはこの特性は決定的ではない。いずれにしても、腫瘍により活性化された内皮細胞のひとつまたはそれ以上のタイプに対する適切な抗体生成ハイブリドーマは、例えばELISA、RIA、IRMA、IIF、または同様の免疫アッセイを用いるスクリーニングによって、一般的に同定される。一旦候補が同定されると、活性化されていないまたは「正常な」内皮あるいはその他の正常な組織または細胞のタイプに対する反応性の欠損についてのテストが望まれている。この様に、特定の適用に際して予測される望ましくない高レベルの正常な交差反応性を有する抗体を生成するハイブリドーマを排除し得る。

【0346】（f）抗エンドグリン抗体）上記の技術を使用することにより、腫瘍血管内皮細胞に対する比較的特異性を有する抗体が調製および分離された。ひとつの特定の例では、HT29ガン腫細胞を用いて馴化培地を調製し、ついで、これを用いて培養中のHUV E細胞を刺激した。結果として生じたHT29-活性化HUV

E細胞は、ついで、ハイブリドーマバンクの調製の免疫原として用いられ、ハイブリドーマバンクはHT29-活性化HUV E細胞を使用するELISA-スクリーニング、さらにはヒトの腫瘍および正常組織の切片の免疫組織学的分析によってスクリーニングされた。このバンクから、腫瘍血管内皮細胞抗原を認識する抗体が選択された。

【0347】腫瘍内皮細胞抗体4および腫瘍内皮細胞抗体11 (TEC4およびTEC11) と命名されたMAbは、上記方法を使用して得られた。TEC4およびTEC11によって認識される抗原は、最終的には分子エンドグリンであると決定された。TEC4およびTEC11によって認識されるエンドグリン上のエピトープは刺激されたHUV E細胞の細胞表面上に存在し、刺激されていない細胞の表面上には最小限度でのみ (または免疫学的に接近可能な程度) 存在する。エンドグリンに対するMAbはすでに生成されている。しかし、HUV E CまたはTCM-活性化HUV E C細胞表面決定基との反応性をFACSまたは間接免疫蛍光検査法によって分析することにより、TEC-4およびTEC-11によって認識されるエピトープが44G4と命名された以前の抗体 (GougosおよびLetarte、1988) のそれとは異なることが示される。

【0348】公知の任意の抗エンドグリン抗体 (例えば、GougosおよびLetarte、1988; Gougosら、1992; O'Connellら、1992; Buhningら、1991) が本発明と関連して使用され得るが、TEC-4およびTEC-11 mAbが特に適切であると考えられる。これは、それらが広範囲の固形腫瘍の (および数種類の慢性炎症性状態および胎児胎盤における) 毛細血管および細静脈内皮細胞を「中程度」から「強度」で標識するが、正常で健康な成人の組織の大多数においては血管の比較的弱い染色を示すからである。TEC-11は実質的に非内皮細胞と反応性を示さないため、特に好ましい。さらに、TEC-4とTEC-11の双方とも補体結合性であり、それにより腫瘍血管床内の内皮細胞の選択的溶解をも誘導する能力が与えられる。

【0349】MAb TEC-4およびTEC-11と交差反応する抗体、すなわちTEC-4またはTEC-11と同じエピトープでのエンドグリンに結合するものも、本発明で有効であると考えられる。TEC-4またはTEC-11と同じエピトープでエンドグリンに結合する抗体の同定は、まったく明白な事柄である。このことは、抗体の競合を評価することのできる種々の免疫学的スクリーニングアッセイの中の任意のものを用いて容易に決定することができる。例えば、検査されるべきテスト抗体がTEC-4またはTEC-11のそれとは異なるソース、例えばウサギから得られる場合、あるいは異なるイソ型、例えばIgG1またはIgG3である場

合でも、競合ELISAが使用され得る。競合ELISAのそのような一実施態様では、TEC-4またはTEC-11を異なる量のテスト抗体と共に事前に混合して、ついで抗原でコートしたELISAプレートのウェルに適用する。抗-ネズミまたは抗-IgM2次抗体のいずれかを使用することによって、結合したTEC-4またはTEC-11抗体のみを検出することができ、それらの結合は、TEC-4またはTEC-11のいずれかと同じエピトープを認識するテスト抗体の存在によって減少される。

【0350】TEC-4またはTEC-11とテスト抗体との間の抗体競合の研究を行うために、最初にTEC-4またはTEC-11を検出可能な標識、例えばビオチンもしくは酵素または放射性標識など標識し得、その後の同定を可能とする。これらの場合は、標識された抗体を試験されるべきテスト抗体と共に種々の比率 (例えば、1:1、1:10および1:100) でインキュベートし、適切な時間の後、標識されたTEC-4またはTEC-11抗体の反応性をアッセイし、これを、インキュベーション中に競合する抗体 (テスト) が含まれなかった場合のコントロール値と比較する。

【0351】アッセイは、抗体結合に基づく免疫学的アッセイの範囲内のひとつであればいかなるものでも良く、TEC-4またはTEC-11抗体は、それらの標識を検出することにより、例えばビオチン化された抗体の場合はストレプトアビジンを使用し、または酵素的標識に関する発色基質を使用することによって、または単に放射性標識を検出することによって検出される。TEC-4またはTEC-11と同じエピトープに結合する抗体は、結合について効果的に競合し得、TEC-4またはTEC-11結合を著しく減少する。これは標識された抗体の結合の減少によって証明される。本ケースでは、標識されたTEC-4またはTEC-11抗体をテスト抗体と混合した後、残りの反応性を決定するのに適切なアッセイとして、例えば、ヒトのエンドグリンを用いるELISA、RIAまたはウエスタンブロット; エンドグリンの免疫沈降反応; ヒトエンドグリンを発現する組換え細胞のELISA、RIAまたは免疫蛍光染色; 腫瘍血管系内皮細胞の間接免疫蛍光染色; HUV E CまたはTCM-活性化HUV E C細胞表面決定基との反応性の間接免疫蛍光検査; およびFACS分析が含まれる。この後者の方法が最も好適であり、TEC-4およびTEC-11によって認識されるエピトープが44G4 (GougosおよびLetarte、1988) のそれとは異なることを示すために採用された。

【0352】いかなるテスト抗体も存在しない状況下での標識されたTEC-4抗体またはTEC-11抗体の反応性は、高いコントロール値である。低いコントロール値は、標識された抗体と同じタイプの標識されていない抗体と共にインキュベートすることによって得られる

が、それは競合が生じ、標識された抗体の結合が減少するときである。標識された抗体反応性のテスト抗体存在下における著しい減少は、同じエピトープを認識するテスト抗体、すなわち標識された抗体と「交差反応」するものが存在することを示す。本願のこの局面における「著しい減少」とは、約1:1の比率での少なくとも約10%~50%、またはより好ましくは約1:100の比率での約90%に等しいまたはそれ以上の結合の再生可能な（すなわち首尾一貫して観察される）減少として定義され得る。

【0353】「交差反応性アッセイ」の使用は、TEC-4またはTEC-11という面における上記の説明のように、本発明に使用し得るいかなる抗体に対しても適用され得る。従って、腫瘍細胞の構成成分、腫瘍血管系の構成成分、腫瘍細胞関連成分、腫瘍血管系関連成分、腫瘍細胞外のマトリクス成分、または本明細書にリストされている細胞タイプと本明細書にリストされている抗体のいかなるものとも同じエピトープで結合し、抗体競合アッセイによって決定される抗体は、凝固剤と組み合わせられ二重特異性リガンドを形成する場合、本発明の範囲に入る抗体となる。

【0354】((g) 血管内皮細胞結合リガンドの使用) 成長因子レセプターのような、内皮細胞表面分子に結合、あるいはそれと相互作用することが知られている生物学的リガンドは、標的化成分としても使用され得る。

【0355】この意味において標的として有用であると考えられる成長因子またはリガンドとして、VEGF/VPF、FGF、TGF β 、TIEに結合するリガンド、腫瘍関連フィブロネクチンイソ型、消散因子(scatter factor)、肝細胞増殖因子(HGF)、血小板因子4(PF4)、PDGFおよびTIMPが含まれる。

【0356】特に好ましい標的は、VEGF/VPF、FGFファミリーのタンパク質およびTGF β である。Abrahamら(1986)はFGFをクローン化し、従って組換えタンパク質として入手可能である。Ferraraら(1991)によって報告されているように、121、165、189、および206個のアミノ酸を有する4種のVEGFがクローン化されている。

【0357】((h) 結合リガンドの標的化) 抗体または特異的標的化リガンドはまた、腫瘍のような疾患部位内の血管内皮細胞の表面に結合するいかなる成分に対しても向けられ得る。このような成分は、腫瘍環境に応答する内皮細胞上で、内皮細胞上に既に存在する特異的細胞表面レセプターに、あるいは誘導または過剰発現されたレセプターに結合する、腫瘍由来のリガンドおよび抗原(例えば、増殖因子)によって例示される。腫瘍血管関連標的はまた、腫瘍由来の内皮細胞結合因子とも命名され得る。

【0358】成功的な疾患標的化のために必要である特異性のレベルは達成される。なぜなら、部分的には、局所内皮細胞が、正常内皮細胞上に存在しないか、または過小発現もしくはマスクされるレセプターを発現または現すために誘導されるからである。腫瘍について、その他の組織のために用い得るリガンドの量が減少することで、腫瘍中の内皮細胞が腫瘍由来の因子を捕獲し、そしてそれらを細胞表面に結合させるという事実のために、さらなる特異性が得られる。血液および組織液のプール中に分配することによる、因子またはリガンドのさらなる希釈と組み合わせられた場合、正常組織内の内皮細胞は、比較的少数のこのような因子を結合すると予期される。従って、操作上は、細胞表面結合リガンドまたは因子は、腫瘍内皮細胞マーカーとして使用することができる。

【0359】腫瘍細胞自身による生成に加え、腫瘍内皮細胞結合因子はまた、腫瘍に浸潤したその他のタイプの細胞(例えば、マクロファージおよびマスト細胞)から生じ得るか、あるいは腫瘍内部で活性化される血小板によって形成され得る。

【0360】腫瘍血管系関連標的として有用であると考えられるさらなる増殖因子またはリガンドとして、EGF、FGF、VEGF、TGF β 、HGF (Nakamura, 1991)、アンジオトロピン(angiotropin)、TGF α 、TNF α 、PD-ECGFおよびTIE結合リガンド(BicknellおよびHarris, 1992)が含まれる。現在の好ましい標的として、VEGF/VPF、FGFファミリーのタンパク質形成転換増殖因子 β (TGF β)；TGF α ；腫瘍壊死因子 α (TNF α)；アンジオトロピン；血小板由来内皮細胞増殖因子(PD-ECGF)；TIE結合リガンド；プレイオトロピンが含まれる。

【0361】本発明の別の局面は、リガンド-レセプター複合体上のみに存在するエピトープに特異的である標的化抗体またはそれ由来の結合領域の使用であり、そのエピトープは、個々の(遊離の)リガンドおよび非結合形態レセプターの双方に存在しない。これらの抗体は、リガンド(例えば、増殖因子)がそのレセプター(例えば、増殖因子レセプター)に結合して、特異的に結合した複合体を形成する場合に生じる独特のコンホメーションを認識し、そしてそれに結合する。このようなエピトープは、リガンドまたはレセプターの非複合体上には存在しない。

【0362】発明者らは、これらの抗体が結合するリガンド-レセプター複合体が、非腫瘍関連内皮細胞上よりも腫瘍関連内皮細胞上に著しく多数で存在することに注目する。従って、このような抗体は標的化剤として有用であり、そして本発明の二重特異性コアギュラントの特異性をさらに増加させるように作用する。

【0363】((i) レセプター構築物) 内皮細胞表面レセプターの可溶性結合ドメインはまた、本発明の標的化リガンドとしての使用も考えられる。この概念は、一般的に、種々のインビトロおよびインビボでの結合プロトコールで利用されている周知のサンドイッチ結合現象に基づく。基本的には、内皮細胞が特異的なレセプターを発現すると、細胞は対応するリガンドに結合し、そしてそれを吸着する。ついで、リガンドがシステム内へ導入されると、さらなるレセプター構築物に結合するためにそれらが用いられ得る。

【0364】有用な内皮細胞レセプターの範囲は、前述のセクションで同定されており、VEGF/VPF、FGF、TGF β 、TIE-1およびTIE-2が特に好ましい標的である。これらのレセプターのそれぞれは、標的化リガンドとしての使用のための可溶性結合ドメインを形成するために操作され得る。

【0365】(4. 疾患関連支質細胞標的)

((a) 細胞外マトリクス/支質標的) 腫瘍病理における基底膜マーカーの有用性が、Birembautら(1985)によって記載された。これらの研究により、基底膜(BM)マーカー、タイプIVコラーゲン、ラミニン(LM)、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSP)、およびフィブロネクチン(FN)の分布が、腫瘍病理において崩壊したことが示された。Burtinら(1983)はまた、ヒトの転移リンパ節内の基底膜および結合組織抗原の変更を記載した。

【0366】本発明での使用のための好ましい標的はRIBSである。Ugarovaら(1993)は、コンホメーション的变化がフィブリノーゲン中に発生し、そして血小板膜糖タンパク質GPIIb-IIIaとの相互作用によって誘導されることを報告した。活性化された血小板上でのフィブリノーゲンの膜糖タンパク質GPIIb-IIIaへの結合は、血小板の凝集を導く。この相互作用の結果、遊離リガンドではなく結合リガンドによって発現される、レセプター誘導の結合部位、RIBS、エピトープの発現によって証明されるように、フィブリノーゲン中におけるコンホメーション的变化が得られる。

【0367】2つのRIBSエピトープが、Ugarovaら(1993)によって局在化された。1つの配列は α 112~119に在り、MAb 9F9によって認識される；2つ目はA α 95~98のRGDF配列であり、mAb 155B16によって認識される。これらのエピトープはまた、フィブリノーゲンのプラスチック表面上への吸着およびプラスミンによる分子の消化によって露呈される。エピトープのタンパク質分解による曝露と同時に、A α -鎖のカルボキシル末端面の切断が生じ、フラグメントX₂を形成する。フィブリノーゲン中でのA α 95~98でのRGDF配列の非アクセス性は、この配列が分子のGPIIb-IIIaへの初期結

合に参加しないことを示唆する。

【0368】フィブリノーゲンのそのレセプターへの結合は、A α -鎖のカルボキシル末端面のコンホメーションを変更し、分子のDドメインとEドメインとの間のコイルドコイル(coiled-coil)の結合セグメント内に在る配列を露呈し、RIBSエピトープを生成する。実際的には、RIBS配列は、凝固リガンド(coagulant)を用いて標的化の際に使用するためのエピトープとして提案される。従って、MAb 9F9およびMAb 155B16は、Zamarronら(1991)によって記載された抗体のように、都合良く使用し得る。

【0369】((b) 付加的細胞標的) 本発明は、疾患領域内に見られる細胞のタイプに対して標的化を行うことによって、コアギュラントを疾患関連血管系に向けるために使用し得るという、さらなる長所を有する。

【0370】血小板は、傷ついた血管壁に付着し損傷部位に蓄積することによって、止血および血栓形成に関与する。生理学的条件下での初期の出血停止は、血管の損傷部位における血小板の堆積がその原因であるが、それは、病理学的条件下では、その後の虚血性組織損傷および血栓による塞栓形成によって、血管閉塞を導き得る。

【0371】血小板とその環境との相互作用、および血小板とそれ自身との相互作用は、細胞表面で始められる複雑なプロセスを表す。従って、表面膜は、血管壁および血漿成分を含む外部媒体と内部の血小板との間の反応性界面を提供する。

【0372】活性化された血小板上に発現される多量体の血小板タンパク質であるp-115(Haywardら、1991)は、本発明を使用して標的化され得る。血小板は、複雑な生化学的および形態学的変化を経ることによって、多数の刺激剤に応答する。これらの変化は、付着、凝集、および凝固を含む生理学的プロセスに含まれる。血小板の活性化は、モノクローナル抗体によって認識され得る膜の変更を生じる。モノクローナル抗体であるJS-1(Haywardら、1991)は、凝固リガンドの一部として使用されることが考えられる、このような抗体のひとつである。

【0373】リガンドに誘導される結合部位(LIBS)は、リガンド結合がレセプターの形状変化を引き起こした後、細胞表面レセプター上に発現される部位であり、その後の生物学的事象を仲介する。これらは、RIBSに対する対応物として見なされ、そして本発明で使用するための好ましい標的でもある。

【0374】13個の抗-LIBS抗体がFrelingerら(1990; 1991)によって開発され、それらの内のいずれもが、本明細書中の記載に従って、疾患または腫瘍の部位へコアギュラントを送達するために使用し得る。マウスのモノクローナル抗血小板抗体であるMA-TSP1-1(ヒトのトロンボスポンジンに対

する)ならびにDewerchinら(1991)のMA-PMI-2、MA-PMI-1、およびMA-LIBS-1(ヒトの血小板糖タンパク質IIb/IIa上のLIBSに対する)もまた、Heynenら(1994)のRUU2.41およびLIBS-1;Tomiyamaら(1992)のOP-G2;およびAb-15のように、使用され得る。

【0375】他の多くの標的(例えば、平滑筋細胞、周皮細胞、線維芽細胞、マクロファージならびに浸潤性リンパ球および白血球上の抗原)も使用し得る。

【0376】(B.凝固剤)本発明の二重特異性薬剤の第2のアーム(arm)あるいは要素は、凝固を促進し得る成分である。「凝固促進薬剤」は、凝固因子、凝固を間接的に刺激する因子であり得、あるいは、凝固因子または凝固を間接的に刺激する因子を結合および放出し得る第2結合領域の形態であり得る。

【0377】(1.凝固因子)以下に示す薬剤によって例示されるように、様々な凝固因子が本発明に関連して用いられ得る。凝固因子が第1結合薬剤と共有結合する場合、機能性凝固部位とは異なる部位が分子の連結に用いられる。凝固因子の、活性部位あるいは機能性領域とは異なる適切な結合領域もまた、以下のセクションのそれぞれに記載される。

【0378】((a)組織因子)組織因子(TF)は、血液凝固を開始し得る1つの因子である。TFは血液凝固の外因性経路の活性化因子であり、生理学的に正常な状態においては、血液と直接接触しない(Osterudら、1986;Nemerson、1988、Broze、1992;Ruf&Edgington、1994)。しかし、血管の損傷時、あるいは特定のサイトカインまたはエンドトキシンにより活性化された場合、内皮(下)細胞(Weissら、1989)または特定の血液細胞(Warrら、1990)のいずれかによってTFは血液に曝される。次いで、TFは、正常な状態においては低濃度で血液中を循環するVIIa因子(Wildgooseら、1992)と複合体を形成し、そして、このTF/VIIa因子複合体は、X因子のXa因子への活性化によって、凝固カスケードを開始する。カスケードによって、最終的に、フィブリンが形成される。

【0379】この連続する事象が起こるために、TF:VIIa複合体は、リン脂質表面と結合しなければならず、この表面にはIXまたはX因子を有する凝固開始複合体が会合し得る(Rufら、1991;Paborskyら、1991;Bachら、1986)。この理由のために、遺伝子を短縮することによって貫膜および細胞質領域を除去した短縮型TF(即ちtTF)は、天然TFのX因子の10万分の1の活性化活性を有する可溶性タンパク質である(Rufら、1991)。

【0380】((b)血餅形成因子(clotting

Factors))トロンビン、第V/Va因子および誘導体、第VIII/VIIIa因子および誘導体、第IX/Xa因子および誘導体、第X/Xa因子および誘導体、第XI/XIa因子および誘導体、第XII/XIIa因子および誘導体、第XIII/XIIIa因子および誘導体、第X因子活性化因子および第V因子活性化因子もまた、本発明に使用され得る。

【0381】((c)ヘビ毒コアギュラント)ラッセルクサリヘビ蛇毒が凝固タンパク質を含有することは、WilliamsおよびEsnoufによって1962年に明らかにされた。Kisiel(1979)は、第V因子を活性化するヘビ毒糖タンパク質を単離し、DiScipioら(1977)は、その毒からのプロテアーゼがヒト第X因子を活性化することを明らかにした。この第X因子活性化因子は、本発明において使用することが意図された成分である。

【0382】ラッセルクサリヘビ蛇毒中に存在する第X因子活性化因子に特異的なモノクローナル抗体(例えば、Pukrittayakameeら、1983、のMP1)もまた生成されており、人体内の特異的標的部位に薬剤を送達するために用いられ得る。

【0383】((d)プロスタグランジンおよび合成酵素)トロンボキサンA₂は、内因性の過酸化物質(endoperoxides)から、血小板ミクロソーム内の酵素シクロオキシゲナーゼおよびトロンボキサンシンターゼの連続的作用によって形成される。トロンボキサンA₂は、血小板によって容易に生成され、そして、強力な血管収縮因子であり、血小板の凝集を起こし得る(Whittleら、1981)。

【0384】トロンボキサンA₂およびその活性類似体の両方は、本発明において使用することが意図されている。トロンボキサンA₂生成のための合成プロトコルは、Bhagwatら(1985)に記載されている。Ohuchidaら(1981)によって記載されたトロンボキサンA₂類似体(特に化合物2)は、本発明に使用することが特に意図されている。

【0385】トロンボキサンシンターゼ、および血小板を活性化するプロスタグランジンを合成する他の酵素もまた、本発明において「コアギュラント」として用いられ得る。ShenおよびTai(1986a;b)は、トロンボキサンシンターゼのモノクローナル抗体および免疫アフィニティー精製を記載し;また、Wangら(1991)は、ヒトトロンボキサンシンターゼのためのcDNAを報告している。

【0386】((e)フィブリン溶解の阻害剤) α 2抗プラスミン、すなわち α 2プラスミン阻害剤は、ヒトの血漿に天然に存在するプロテナーゼ阻害剤であり、プラスミノゲン活性化因子によって誘導されるフィブリン塊(clots)の溶解を効果的に阻害する機能を果たす(Moroi&Aoki、1976)。 α 2抗プラス

ミンは、特に強力な阻害剤であり、本発明において使用することが意図されている。

【0387】 $\alpha 2$ 抗プラスミンは精製され得るが、これは最初にMoroi & Aoki (1976)に記載されている。他の精製スキームもまた用いられ得る。例えば、プラスミノゲンセファロース上でのアフィニティークロマトグラフィー、DEAEセファデックス上でのイオン交換クロマトグラフィー、およびコンカナバリンAセファロース上でのクロマトグラフィーを行う；あるいは、プラスミンA鎖(LBSI)内の3つのN末端三重ループ構造を含有するエラストラーゼ消化(elastase-digested)プラスミノゲン処方剤(formulation)を有するセファロースカラム上でのアフィニティークロマトグラフィーを行い、次いでゲル濾過を行う(それぞれ、Wiman & Collen、1977; Wiman、1980)、などである。

【0388】 $\alpha 2$ 抗プラスミンのcDNA配列(Toneら、1977)が利用できるので、 $\alpha 2$ 抗プラスミン生成の好適な方法は、組換え発現による。

【0389】 $\alpha 2$ 抗プラスミンに対するモノクローナル抗体もまた利用でき、本発明の二重特異性結合リガンドの実施態様として使用され得る。例えば、Hattleyら(1987)は、 $\alpha 2$ 抗プラスミンに対する2つのMAb、MPW2APおよびMPW3APを記載した。これらのMAbのそれぞれは、同等に良好に、天然の $\alpha 2$ 抗プラスミンと反応することが報告されているので、それら両方が、外因性の $\alpha 2$ 抗プラスミンを標的部位に送達するため、あるいは内因性の $\alpha 2$ 抗プラスミンを蓄積してそれを標的領域内に濃縮するために使用され得る。Mimuroおよび共同研究者によって記載されたJTP1-2などの他の抗体もまた使用され得る。

【0390】(2. 凝固因子を結合する薬剤) 本発明の他の群の二重特異性凝固リガンドは、標的化領域が凝固因子に直接連結されるのではなく、凝固因子に結合する第2結合領域に連結される。

【0391】第2結合領域を用いて凝固因子を結合および送達する場合、その結合領域は、凝固誘導能力を大きく損なわないような凝固因子上の部位を認識するように選択される。このような結合に適した凝固因子の領域は、前のセクションに記載したように、標的化領域への共有結合に適した領域と、一般的に同じである。

【0392】しかし、このクラスの二重特異性リガンドは、腫瘍部位あるいは領域への送達の後、凝固因子を放出することが予想され得るため、第2結合薬剤あるいは抗体への結合に適した凝固因子の領域には、より大きな柔軟性がある。また別の利点は、二重特異性抗体が、tTF注入の前に予め局在化され得ることであり、これは、必要なtTFの量、ひいては毒性を低減し得る。

【0393】この方法での使用に適切な第2結合領域

は、一般的に、凝固因子に対する結合特異性を有する抗体の抗原結合部位であり、scFv、Fv、Fab'、FabおよびF(ab')₂フラグメントなどの抗体の機能性部分を含む。

【0394】組織因子、トロンビン、プレカリクレイン(prekallikain)、第V/Va因子、第VII/VIIa因子、第IX/IXa因子、第X/Xa因子、第XI/XIa因子、第XII/XIIa因子、第XIII/XIIIa因子、ラッセルクサリヘビ蛇毒、トロンボキサンA₂または $\alpha 2$ 抗プラスミンに対する抗体あるいはそのフラグメントを含有する二重特異性結合リガンドは、本発明のこの局面の実施態様の例示である。

【0395】(C. 連結手段) 第1標的化領域および第2凝固領域は、作動可能に連結され、これにより、各領域が、重大な障害を伴わずに、意図された機能を果たすことが可能になる。このように、標的化領域は、腫瘍環境標的の範囲から選択されるように、意図された標的に結合することが可能であり、また、凝固領域は、直接的または間接的に、例えば結合した因子の放出によって、血液凝固あるいは血餅形成を促進することが可能である。

【0396】標的化領域結合機能を評価するために必要とされることは、二重特異性リガンドが依然として、複合体を形成していない第1結合領域と実質的に同じ方法で、標的化された成分に結合することを確かめるために、結合アッセイを行うことである。適切な結合アッセイは、通常用いられるタイプのアッセイであり、第1標的化領域が抗体である免疫学的な結合アッセイ、および/または他の生化学的な結合アッセイであり、例えば、¹²⁵Iヨウ素標識されたタンパク質または他の放射標識された成分を用いてリガンド-レセプター結合を評価し、スキッチャードプロットを生成するようなアッセイである。

【0397】このようなアッセイにおける標的抗原あるいは標的成分は、天然または組み換え体供給源から精製されるタンパク質、膜濃縮調製物、無傷の(intact)細胞および組織切片を含む数多くの形態で提供され得る。一般に、タンパク質組成物が使用される場合、それらは、マイクロタイタープレート、膜、などの固体の支持体に、あるいは、カラムマトリクスにさえ固定される。また、生理学的標的を反映する標的組成物を使用するのが一般的に好ましく、標的が通常、細胞関連であるので、組織および細胞自体を含む無傷の細胞を含む組成物の使用もまた好ましい。

【0398】二重特異性複合体の機能性結合の確認に用いられる種々の免疫学的アッセイは、例えば、ウェスタンブロッティング、ELISA、固定細胞を用いたELISA、免疫組織化学、および蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)を含む。このようなアッセイの全ての

実施は、一般に、当業者には公知であり、本明細書でさらに開示される。

【0399】上記または他の結合アッセイのいずれにおいても、二重特異性化合物の標的化領域結合機能の評価は容易なことであり、二重特異性リガンドと、複合化していない第1結合領域とは、通常、比較を容易にするために、同じ条件下で平行してアッセイに供される。効果的な二重特異性リガンドは、大きな障害を伴わずに、つまり、複合化していない第1結合領域と実質的に同じ様に、標的に結合する。複合化していない結合領域アッセイの結果を100%の基準値とすると、本明細書の用語、二重特異性リガンドの「実質的な結合」とは、二重特異性リガンドが少なくとも約50%の結合、より好ましくは、約50%から約80%の間の結合、さらに、最も好ましくは、約80%から約100%の間の結合を示すことを意味する。

【0400】二重特異性リガンドが、コアギュラントに結合する第2結合領域を含む場合、例えば、二重特異性抗体である場合、さらに有用なアッセイは、二重特異性リガンドの両方のアームの結合機能が同時に評価できるタイプのものである。これは、例えば、二重特異性リガンドまたは抗体との架橋を介する、放射標識されたコアギュラントの標的細胞への結合を評価することによって達成される。このようなアッセイは、B21-2/10H10二重特異性抗体を用いた、tTFの標的細胞への結合によって例示され、実施例IIに記載されている。

【0401】二重特異性リガンドの凝固剤機能を決定することもまた、容易なことである。ここで必要とされることは、二重特異性リガンドを用いた凝固アッセイを行い、それが、複合化していない凝固剤と実質的に同じ方法で、凝固を促進する機能を果たすことを確かめることである。このことは、それら自体が共に凝固因子である「凝固剤」、および凝固因子に結合する第2結合領域であるものについて当てはまる。当然、後者の場合、第2結合領域への結合を可能にするために、二重特異性リガンドは、*in vitro*あるいは*ex vivo*アッセイにおいて凝固因子と予め複合化される。

【0402】1つの適切な凝固アッセイは、必要に応じて予めコアギュラントと複合化される二重特異性リガンドが、血漿サンプルと混合される。このアッセイにおいては、フィブリンストランドの出現が凝固を示す。したがって、効果的な二重特異性リガンドは、フィブリンストランドが出現するまでの時間を短縮し、特に、コントロールのレベルと比較して経過時間を有意に短縮することが期待される。

【0403】上記アッセイの改変例は、まず、適切な標的細胞を有効な条件下および十分な時間、二重特異性リガンドにさらして結合させること、非特異的に結合した成分を除去するために細胞を洗浄すること、次いで、洗浄された細胞を血漿内で再懸濁することを包含する。こ

のアッセイでは、二重特異性リガンドで効果的にコーティングされた細胞のみが、フィブリンストランドが出現するまでの時間を短縮すると期待される。このタイプのアッセイは、それ自体が二重特異性構築物の機能の両方、即ち、細胞の初期標的化、およびその後の局在化された凝固を評価するアッセイである点で好ましい。

【0404】二重特異性化合物の凝固機能を、複合化していない凝固剤のそれと比較するためには、再び、平行したアッセイが行われる。効果的な二重特異性リガンドは、大きな障害を伴わずに、凝固を促進する機能を果たす、つまり、複合化していない凝固剤と実質的に同じ様に機能する。複合化していないコアギュラントアッセイの結果を100%の基準値とすると、本明細書の用語「実質的な機能」とは、二重特異性リガンドが少なくとも約50%の凝固、より好ましくは、約50%から約80%の間の凝固、さらに、最も好ましくは、約80%から約100%の間の凝固を示すことを意味する。

【0405】二重特異性リガンドの2つの機能性領域は合成化学技術あるいは組み換えDNA技術を用いて連結され得る。これらの技術のそれぞれは、通常採用され、当業者には周知であり、実施例Iにおいて、また、以下の詳細な説明によってさらに例示される。

【0406】(1. 生化学的架橋剤(cross-linker)) 一般に、抗体または他の標的化成分の凝固剤への結合には、イムノトキシンの調製のために開発されたものと同じ技術が適用される。しかし、生理学的に用いられるようになる特定の量の複合化していない凝固剤が、特に厳密なものを意図しないゆえに、本技術に相当な利点があることは明らかである。このように、いかなる架橋剤の安定性要件も、イムノトキシンなどの他の構築物に採用されるリンカー程厳密ではない。したがって、イムノトキシンにおける使用に適したあらゆる架橋剤もまた本発明において使用できることが、一般的なガイドラインとして考慮され得、そして、さらなるリンカーもまた考慮され得る。

【0407】トキシンに加えて、他の様々な化学療法および薬理学的な薬剤が抗体に連結され、薬理学的に機能することが明らかになっている接合体が形成されている(例えば、Vaickusら、1991、参照)。調査された抗腫瘍性薬剤の例は、ドキソルビシン、ダウノマイシン、メトトレキサート、およびビンブラスチンその他を含む(Dillmanら、1988; Pieterszら、1988)。また、ネオカルチノスタチン(Kimuraら、1983)、マクロマイシン(macromycin)(Manabeら、1984)、トレニモン(trenimon)(Ghose、1982)および α アマニチン(α -amanitin)(Davis & Preston、1981)などの他の薬剤の結合が記載されている。上記科学論文のそれぞれに記載される連結技術もまた、本発明に関連して使用すること

が意図されている。

【0408】架橋試薬を用いて2つの異なる分子の官能基、例えば結合および凝固剤を互いに結びつける分子架橋が形成される。2つの異なるタンパク質を段階的に連

結するために、望ましくないホモポリマーの形成を排除するヘテロ2機能性架橋剤が用いられ得る(表VI)。

【0409】

【表6】

表VI

ヘテロ2機能性架橋剤

リンカー	反応性を有する対象	利点および用途	スペーサーアームの長さ 架橋後
SMPT	第1級アミノスルフィド	・ より高い安定性	11.2 Å
SPDP	第1級アミノスルフィド	・ チオール化 ・ 切断可能な架橋	6.8 Å
LC-SPDP	第1級アミノスルフィド	・ 延長スペーサーアーム	15.6 Å
スルホ-LC-SPDP	第1級アミノスルフィド	・ 延長スペーサーアーム ・ 水溶性	15.6 Å
SMCC	第1級アミノスルフィド	・ 安定なマレイミド反応基 ・ 酵素-抗体結合 ・ ハプテン-キャリアタンパク質結合	11.6 Å
スルホ-SMCC	第1級アミノスルフィド	・ 安定なマレイミド反応基 ・ 水溶性 ・ 酵素-抗体結合	11.6 Å
MBS	第1級アミノスルフィド	・ 酵素-抗体結合 ・ ハプテン-キャリアタンパク質結合	9.9 Å
スルホ-MBS	第1級アミノスルフィド	・ 水溶性	9.9 Å

表VIの続き

リンカー	反応性を有する対象	利点および用途	スペーサーアームの長さ 架橋後
SIAB	第1級アミノスルフィド	・ 酵素-抗体結合	10.6 Å
スルホ-SIAB	第1級アミノスルフィド	・ 水溶性	10.6 Å
SMPB	第1級アミノスルフィド	・ 延長スペーサーアーム ・ 酵素-抗体結合	14.5 Å
スルホ-SMPB	第1級アミノスルフィド	・ 延長スペーサーアーム ・ 水溶性	14.5 Å
EDC/スルホ-NHS	第1級アミノカルボキシル基	・ ハプテン-キャリア結合	0
ABH	非選択的な炭水化物	・ 糖基と反応	11.9 Å

例示的なヘテロ二官能性架橋剤は2つの反応基を含む：一方は一級アミノ基(例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド)と反応し、他方はチオール基(例えば、ピリジルスルフィド、マレイミド、ハロゲンなど)と反応する。架橋剤は、一級アミノ反応基を介して、一方のタンパク質(例えば、選択された抗体またはフラグメント)のリジン残基(単数または複数)と反応し得、そして既に第1のタンパク質に結合した架橋剤は、チオール反応基を介して、他方のタンパク質(例えば、コアギュラント)のシステイン残基(遊離メルカプト基)と反応する。

【0410】従って、好適なコアギュラントまたは凝固結合領域は、一般には、架橋のために利用可能な官能基

を有するか、または有するように誘導体化されることが理解され得る。この要件により、広範囲な基をこの様式で用い得ることが制限されるとは考えられない。例えば、一級または二級アミノ基、ヒドラジド基またはヒドラジン基、カルボキシルアルコール基、リン酸基、もしくはアルキル化基が、結合または架橋のために用いられ得る。連結技術の概略については、Ghose & Blair (1987)を参照のこと。

【0411】架橋剤の2つの反応基の間のスペーサーアーム(spacer arm)は様々な長さおよび化学組成を有し得る。スペーサーアームが長いほど、接合成分の柔軟性(flexibility)が良好になり、一方、ブリッジのいくつかの特定の成分(例えば、ベン

ゼン基)により、反応基に安定性の増加がもたらされるか、または様々な局面の作用に対する化学結合の耐性(例えば、還元剤に対するジスルフィド結合の耐性)の増加がもたらされ得る。L-Leu-L-Ala-L-Leu-L-Alaのようなペプチドスパーサーの使用もまた意図される。

【0412】血液中で適切な安定性を有する架橋剤を用いるのが好ましい。標的化剤および凝固剤を接合するためにうまく用いられ得る数多くのタイプのジスルフィド結合含有結合剤が知られている。立体的に障害をもつジスルフィド結合を含む結合剤は、インビボにおいてより高い安定性を示し、これにより作用部位での結合前にコアギュラントが放出されるのを防止し得ることが分かる。従って、このような結合剤は、結合剤1つの好適なグループである。

【0413】イムノトキシンで使用するのに最も好適な架橋剤の1つはSMP Tである。SMP Tは、隣接するベンゼン環およびメチル基によって「立体障害をもつ」ジスルフィド結合を含有する二官能性架橋剤である。ジスルフィド結合の立体障害は、組織および血液中に存在し得るグルタチオンのようなチオレートアニオンによる攻撃から結合を保護する機能を有し、これにより、結合した薬剤が腫瘍部位に送達される前に接合体が分離するのを防ぐのを補助すると考えられる。SMP T薬剤もまた、本発明の二重特異性凝固リガンドと共に用いられ得ることが意図される。

【0414】多くの既知の他の架橋剤と同様に、SMP T架橋剤は、システインのSHまたは一級アミンのような官能基(例えば、リジンのεアミノ基)を架橋する能力を有する。別の可能なタイプの架橋剤としては、スルホスクシンイミジル-2-(p-アジドサリチルアミド)エチル-1,3'-ジチオプロピオネートのような切断可能なジスルフィド結合を含有するヘテロ二官能性光反応性フェニルアジドが挙げられる。N-ヒドロキシスクシンイミジル基は一級アミノ基と反応し、フェニルアジドは(光分解の際に)非選択的に任意のアミノ酸残基と反応する。

【0415】立体障害をもつ架橋剤に加えて、立体障害をもたない結合剤もまた本発明において使用され得る。保護されたジスルフィドを含有または生成するとは考えられない他の有用な架橋剤としては、SATA、SPDP、および2-イミノチオラン(Wawrzyniak & Thorpe, 1987)がある。このような架橋剤の使用は当該分野では充分理解されている。

【0416】ひとたび接合体化されると、二重特異性薬剤は通常は精製され、未接合体化標的化剤またはコアギュラントおよび他の混入物質から接合体が分離される。未接合標的化剤を取り除いて、接合体化種と未接合体化種との間で抗原をめぐる競合が起こる可能性を防ぐことが重要である。充分な純度を有する接合体を提供してこ

れらを臨床的に有用にする際に、多くの精製技術が利用可能である。ゲル濾過、ゲル透析または高速液体クロマトグラフィーのような、サイズ分離に基づく精製方法が一般に最も有用である。Blue-Sepharose分離のような他のクロマトグラフィー技術もまた用いられ得る。

【0417】(2. 組換え融合タンパク質) 本発明の二重特異性標的コアギュラントはまた、分子生物学技術によって調製される融合タンパク質であり得る。このような目的を達成するために組換えDNA技術を用いることは、現在では当業者にとって通常の作業である。このような方法としては、例えば、インビトロにおける組換えDNA法、合成技術、およびインビボにおける組換え/遺伝子組換えがある。さらに、DNAおよびRNA合成は、自動合成機を用いて行い得る(例えば、Sambrookら、1989; およびAusubelら、1989に記載されている技術を参照)。

【0418】一般に、融合タンパク質を調製するためには、結合リガンドまたは他の標的化領域をコードする遺伝子またはcDNAのようなDNAコード領域を、凝固因子または凝固結合領域をコードするDNAコード領域(すなわち、遺伝子またはcDNA)に結合させる。これは、代表的には、凝固因子をコードする第2 DNAセグメントに作動可能に連結した第1結合領域をコードする第1 DNAセグメントを、同じリーディングフレーム内に含む発現ベクターを調製する工程を包含する。配列は、核酸全体を翻訳すると本発明の所望の二重特異性化合物が得られるような方法で結合する。発現ベクターは、挿入されたDNA領域より上流側に、DNAの転写を促進し、これによりコードされる組換えタンパク質の発現を促進するように作用する1つまたはそれ以上のプロモーターを含む。これが「組換え発現」の意味である。

【0419】特定の結合領域またはコアギュラントが好適であるが、コードDNAが直ちに利用できない場合は、これは、所望のタンパク質をコードするDNA分子をDNAライブラリー(例えば、cDNAまたはゲノムライブラリー)から得る「分子クローニング」の技術を用いて得られ得る。このような手順では、適切なDNAライブラリーが、例えば、タンパク質に対する抗体を用いる発現スクリーニングプロトコル、または活性アッセイを用いてスクリーニングされる。もしくは、スクリーニングは、タンパク質のアミノ酸配列部分を考慮して、または関連タンパク質をコードする遺伝子のDNA配列から設計されたオリゴヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションに基づいてもよい。このようなスクリーニングプロトコルの操作は当業者には周知であり、科学文献、例えば、Sambrookら(1989)に詳細に記載されている。

【0420】組換えDNA技術により産生されるとき

は、本発明の標的化剤／凝固剤化合物は「融合タンパク質」と呼ばれる。このような融合タンパク質は、少なくとも、本発明で定義される標的化剤および凝固剤を含み、そしてこれらの薬剤は作動可能に結合されることが理解される。融合タンパク質はまた、得られる融合タンパク質の標的化または凝固活性にある程度の影響を与えない限り、標的化剤および凝固剤化合物を作動可能に連結するペプチドスペーサーのようなさらなるペプチド配列を含み得る。

【0421】組換え二重特異性タンパク質リガンドは、いわゆる天然に産生されたタンパク質を化学的に架橋することによって生成される二重特異性構築物とは異なり得る。特に、例えば、グリコシル化およびリン酸化のような翻訳後の修飾の程度は、同じ2つのタンパク質の組換え融合体と化学的融合体との間で異なり得る。これは重大な問題であるとはみなされないが、当業者であれば、臨床設定で使用する前に、組換え融合タンパク質が、意図したように、そして他のデータから想定されるように機能するかどうかを確認し得る。

【0422】組換え発現の1つの利点は、結合領域を、例えばその長さおよび／またはアミノ酸組成が容易に変動し得るように容易に操作し得ることである。所望であれば、本発明の2つの薬剤を作動可能に連結するために、切断不能なペプチドスペーサーが提供され得る。同様に、固有の切断部位を有するペプチドを2つの化合物の間に挿入し得る。

【0423】特定の場合、所望であれば、ジスルフィド結合ループ構造に折り畳み得る、標的化剤および凝固剤を作動可能に連結するペプチドスペーサーを提供することが可能である。ループ内のタンパク質分解性切断により、標的化剤と凝固剤とが単一のジスルフィド結合のみによって連結されているヘテロ二量体ポリペプチドが生成される（例えば、Lordら、1992参照）。

【0424】様々な宿主発現系でタンパク質の発現を実現するために、適切な核酸および転写／翻訳制御配列を含む発現ベクターを構築するための多くの標準的な技術が利用可能である。発現に利用し得る細胞型としては、標的化剤／凝固剤コード化配列を含有する、組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターにより形質転換された細菌（例えば、大腸菌、*B. subtilis*）；標的化剤／凝固剤コード配列を含む組換え酵母発現ベクターにより形質転換された酵母（例えば、*Saccharomyces*、*Pichia*）；標的化剤／凝固剤コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系；組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルスCaMV；タバコモザイクウイルスTMV）を感染させた、または標的化剤／凝固剤コード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）により形質

転換された植物細胞系；および哺乳類細胞のゲノム由来のプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）、または哺乳類ウイルス由来のプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含む組換え発現構築物を有する哺乳類細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3）のような微生物があるが、これらに限定されない。

【0425】細菌系では、発現される標的化剤／凝固剤構築物について意図される用途に応じて、多くの発現ベクターが有利に選択され得る。例えば、多量の二重特異性薬剤を産生する場合は、容易に精製される高レベルの融合タンパク質産物の発現を指向するベクターが望ましい。このようなベクターとしては、標的化剤／凝固剤コード配列が、lacZコード領域を有するベクターのフレーム内に個別に連結され得、これによりlacZ産物部分をさらに含む融合タンパク質が提供される、大腸菌発現ベクターpUR278（Rutherfordら、1983）；pINベクター（Inouyeら、1985；Van Heekeら、1989）などがあるが、これらに限定されない。pGEXベクターは、標的化剤／凝固剤の組み合わせのような外来ポリペプチドを、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）をさらに含む融合タンパク質として発現するためにも用いられ得る。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン-アガロースビーズへの吸着およびこの後の遊離グルタチオンの存在下での溶出によって、溶解した細胞から容易に精製され得る。pGEXベクターはトロニンまたは第Xa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計され、これにより融合タンパク質全体の中の結合剤／凝固タンパク質がGST部分から放出され得る。

【0426】1つの有用な昆虫系では、*Autographa californica*核多角体病ウイルス（AcNPV）が、外来遺伝子を発現するためのベクターとして用いられる。このウイルスは、*Spodoptera frugiperda*細胞内で増殖する。標的化剤／凝固剤コード配列は、ウイルスの非必須領域（例えば、ポリヘドリン遺伝子）にクローン化され、AcNPVプロモーター（例えば、ポリヘドリンプロモーター）の制御下に配置され得る。二重特異性リガンドコード配列を首尾良く挿入することによって、ポリヘドリン遺伝子が不活性となり、非閉塞（non-occluded）組換えウイルス（例えば、ポリヘドリン遺伝子によってコードされるタンパク質コートを欠いたウイルス）が産生される。このような組換えウイルスは、次に、挿入した遺伝子を発現させる*Spodoptera frugiperda*細胞を感染させるために用いられる（例えば、Smithら、1983；*Smithの米国特許第4,215,051号参照）。

【0427】哺乳類宿主細胞では、多数のウイルスベ-

スの発現系が利用され得る。アデノウィルスを発現ベクターとして用いる場合は、標的化剤／凝固剤コード配列を、アデノウィルス転写／翻訳制御接合体（例えば、後期プロモーターおよび三部分（tripartite）リーダー配列）に連結し得る。このキメラ遺伝子は、次に、インビトロにおけるまたはインビボにおける組換えによってアデノウィルスゲノムに挿入され得る。ウィルスゲノムの非必須領域（例えば、領域E1またはE3）への挿入により、生存能力があり、感染宿主内に二重特異性タンパク質を発現し得る組換えウィルスが得られる（例えば、Loganら、1984参照）。

【0428】挿入された標的化剤／凝固剤コード配列を効率的に翻訳するためには、特異的な開始シグナルもまた必要であり得る。このようなシグナルは、ATG開始コドンおよび隣接する配列を含む。ATG開始コドンを含む外因性の翻訳制御シグナルをさらに備える必要があり得る。当業者であれば容易にこれを決定し、必要なシグナルを備え得る。開始コドンは、挿入物全体の翻訳を確実にするために、所望のコード配列のリーディングフレームと同調（すなわちインフレーム）していなければならないことは周知である。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然および合成を問わず多様な起源から得られ得る。適切な転写エンハンサー要素、転写ターミネーターなどを加えることによって、発現効率が増強され得る（Bittnerら、1987参照）。

【0429】さらに、挿入された配列の発現を調節するか、または遺伝子産物を所望の特異的な様式で修飾およびプロセスする宿主細胞株が選択され得る。タンパク質産物のこのような修飾（例えば、グリコシル化）およびプロセッシング（例えば、切断）は、タンパク質の機能にとって重要であり得る。宿主細胞はそれぞれ、タンパク質の翻訳後プロセッシングおよび修飾のための特徴的かつ特異的な機構を有する。発現された外来タンパク質の適切な修飾およびプロセッシングを確実にするために、適切な細胞株または宿主系が選択され得る。この目的のために、遺伝子産物の一次転写、グリコシル化、およびリン酸化の適切な処理のための細胞機構を有する真核生物宿主細胞が用いられ得る。このような哺乳類宿主細胞としては、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、WI38などがあるが、これらに限定されない。

【0430】組換えタンパク質を長期にわたり高収量で産生するためには、安定した発現が好ましい。例えば、標的化剤／凝固剤リガンドをコードする構築物を安定して発現する細胞株が設計され得る。ウィルスの複製起点を含む発現ベクターを用いるよりむしろ、宿主細胞は、適切な発現制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）によって制御される標的化剤／凝固剤DNAおよび

選択マーカーにより形質転換され得る。外来DNAの導入後、設計された細胞を富養培地で1～2日増殖させ、次に選択培地に置き換える。組換えプラスミド中の選択マーカーによりこの選択に対する耐性が付与され、細胞がそれぞれの染色体にプラスミドを安定して組み込み、増殖してフォーカスを形成し、これが次にクローン化され、拡大されて細胞株となり得る。

【0431】ヘルペス単純ウィルスチミジンキナーゼ（Wiglerら、1977）、ヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Szybalskaら、1962）、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（Lowyら、1980）を含むがこれらに限定されない多くの選択系が用いられ得、これらはそれぞれ、tk⁻、hgprt⁻、またはaprt⁻細胞で用いられ得る。また、メトトレキサートに対する耐性を付与するdhfr（Wiglerら、1980；O'Hareら、1981）；ニコフェノール酸に対する耐性を付与するgpt（Mulliganら、1981）；アミノグリコシドG-418に対する耐性を付与するneo（Colberre-Garapinら、1981）；およびヒグロマイシンに対する耐性を付与するhygro（Santerreら、1984）の選択の基礎として、代謝拮抗物質耐性が用いられ得る。

【0432】（D. 抗体）抗体が二重特異性リガンドの一方または両方の一部として用いられる場合、抗体の選択は、一般に腫瘍のタイプおよび選択される凝固剤リガンドに依存する。しかし、ある有利点は、特定のタイプの抗体の適用により達成され得る。例えば、IgGベースの抗体は、そのFab' 対応物よりも良好な結合能力および遅い血中クリアランスを示すことが予測され得るが、Fab' フラグメントベースの組成物は、一般に、良好な組織浸透能力を示す。

【0433】（1. モノクローナル抗体）抗体を調製し特徴付けする手段は当業者に周知である（例えば、* Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）。

【0434】モノクローナル抗体（MAb）を生成する方法は、一般に、ポリクローナル抗体を調製するための方針と同じ方針に沿って始める。簡単にいえば、ポリクローナル抗体は、動物を、用いられている抗原組成物およびプロトコル（例えば、正常細胞集団に寛容になり、次いで腫瘍細胞集団で免疫すること）に依存して、免疫寛容前または免疫寛容前でないいずれかに、本発明に従って免疫原性組成物で免疫し、そして免疫された動物から抗血清を回収することにより、調製される。広範な動物種が抗血清の生成に用いられ得る。代表的には、抗-抗血清の生成に用いられる動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、またはヤギである。ウ

サギの血液量が比較的大量であるため、ウサギはポリクローナル抗体の生成のための好適な選択である。

【0435】当該分野で周知のように、所定の組成物はその免疫原性が変化し得る。従って、宿主の免疫系をブーストすることがしばしば必要であり、これはペプチドまたはポリペプチド免疫原をキャリアに結合することにより達成され得る。代表的かつ好適なキャリアは、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) およびウシ血清アルブミン (BSA) である。オボアルブミン、マウス血清アルブミン、またはウサギ血清アルブミンのような他のアルブミンもまた、キャリアとして用いられ得る。ポリペプチドをキャリアタンパク質に結合する手段は当該分野において周知であり、そしてグルタルアルデヒド、*m*-マレイミドベンゾイル (maleimido benzoyl)-*N*-ヒドロキシスクシンイミドエステル、カルボジイミド (carbodiimide)、およびビス-ジアゾ化ベンジジン (bis-diazotized) を含む。

【0436】当該分野においてまた周知のように、特定の免疫原組成物の免疫原性は、アジュバントのような公知の免疫応答の非特異的刺激剤の使用により増強され得る。代表的かつ好適なアジュバントとしては、完全フロイントアジュバント (死滅 *Mycobacterium tuberculosis* を含む免疫応答の非特異的刺激剤)、不完全フロイントアジュバント、および水酸化アルミニウムアジュバントが挙げられる。

【0437】ポリクローナル抗体の産生に用いられる免疫原組成物の量は、免疫原の性質ならびに免疫に用いられる動物によって変化する。種々の経路が免疫原の投与に用いられ得る (皮下、筋肉内、皮内、静脈内、および腹腔内)。ポリクローナル抗体の産生は、免疫後の種々の時点で免疫された動物の血液をサンプリングすることによりモニターされ得る。第二に、追加接種もまた与えられ得る。追加免疫および力価検定のプロセスは、適切な力価が達成されるまで繰り返され得る。所望の力価レベルが得られると、免疫された動物を出血させ得、そして血清を単離して保存し、および/または動物を MA b を生成するために用い得る。

【0438】MA b は、* 米国特許第4, 196, 265号 (本明細書中に参考として援用される) に例示されるように、周知の技法の使用により容易に調製され得る。代表的には、この技法は、選択された免疫原組成物 (例えば、精製または部分精製腫瘍細胞あるいは血管内皮細胞タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、または完全な細胞組成物) で適切な動物を免疫することを包含する。免疫する組成物は、抗体産生細胞を刺激するために効果的な様式で投与される。マウスおよびラットのような齧歯類は好適な動物であるが、ウサギ、ヒツジ蹄叉細胞の使用もまた可能である。ラットの使用はある有利点を提供し得る (* Goding, 1986, 60-61

頁) が、マウスが好適であり、BALB/c マウスが最も好適であり、これは最も日常的に用いられ、そして一般に、より高い割合の安定な融合を生じる。

【0439】免疫後、抗体産生能力のある体細胞、特にBリンパ球 (B細胞) が、MA b 生成プロトコルにおける使用について選択される。これらの細胞は、生検された脾臓、扁桃腺、またはリンパ節から、あるいは末梢血サンプルから得られ得る。脾臓細胞および末梢血細胞が好適であり、前者は、分裂形質芽球期における抗体産生細胞の豊富な供給源であるためであり、そして後者は末梢血が容易に入手し可能であるからである。時折、パネルの動物が免疫され、そして最高の抗体力価を有する動物の脾臓が取り出され、そして脾臓リンパ球が脾臓をシリンジでホモジナイズすることにより得られている。代表的には、免疫されたマウス由来の脾臓は、約 $5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ のリンパ球を含む。

【0440】免疫された動物由来の抗体産生Bリンパ球は、次いで、不死化ミエロマ細胞の細胞、一般に免疫された動物と同種の細胞、と融合される。好適には、ハイブリドーマ産生融合手順に使用するために適したミエロマ細胞株は非抗体産生であり、高い融合効率、および次いで、所望の融合細胞 (ハイブリドーマ) のみの増殖を支持するある選択培地中での増殖を不可能にする酵素欠損を有する。

【0441】多くのミエロマ細胞の任意の1つが、当業者に知られているように用いられ得る (* Goding, 65-66頁, 1986; * Campbell, 75-83頁, 1984)。例えば、免疫された動物がマウスである場合、P3-X63-/Ag8, X63-Ag8, 653, NS1/1, Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG1, 7, およびS194/5XX0 Bu1を使用し得; ラットについては、R210, RCY, RCY3, Y3-Ag 1, 2, 3, IR983F, 4B210, または上記に挙げたマウス細胞株の1つを使用し得; そして、U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2, およびUC729-6はヒト細胞融合と関連して全て有用である。

【0442】1つの好ましいマウスミエロマ細胞はA63-A68, 653ミエロマ細胞株であり、これはATCCから容易に入手可能である。用いられ得る別のマウスミエロマ細胞株は、8-アザグアニン耐性マウスミエロマSP2/0非産生細胞株である。

【0443】抗体産生脾臓細胞またはリンパ節細胞とミエロマ細胞とのハイブリッドを生成する方法は、通常、体細胞をミエロマ細胞と4:1の割合で混合する工程を包含するが、この割合は、細胞膜の融合を促進する1つの薬剤または複数の薬剤 (化学物質または電気的物質) の存在下、それぞれ約20:1~約1:1まで変化し得る。Sendaiウイルスを用いる融合方法は、

KohlerおよびMilstein (1975; 1976) に記載されており、そして37% (v/v) PEGのようなポリエチレングリコール (PEG) を用いる方法がGefterら (1977) により記載されている。電氣的に誘導される融合方法の使用もまた適切である (* Goding, 71-74頁、1986)。

【0444】融合手順は、通常、低い頻度、約 1×10^{-6} ~ 1×10^{-8} で生存可能なハイブリッドを産生する。しかし、これは、選択培地中で培養することにより、生存可能な融合されたハイブリッドが親の非融合細胞 (特に正常には無限に分裂し続ける非融合ミエローマ細胞) から分化されるような問題を提起しない。この選択培地は、一般に、組織培養培地でヌクレオチドの新規合成をブロックする薬剤を含む培地である。代表的かつ好適な薬剤は、アミノプテリン、メトトレキセート、およびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキセートは、プリンおよびピリミジンの両方の新規合成をブロックするが、アザセリンはプリン合成のみをブロックする。アミノプテリンまたはメトトレキセートが用いられる場合、培地にヌクレオチド供給源としてヒポキサンチンおよびチミジンが補充される (HAT培地)。アザセリンが用いられる場合、培地にヒポキサンチンが補充される。

【0445】好適な選択培地はHATである。ヌクレオチドサルベージ経路の操作可能な細胞のみが、HAT培地中で生存し得る。ミエローマ細胞はサルベージ経路の重要な酵素 (例えば、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPR T)) が欠損しており、そしてそれらは生存し得ない。B細胞はこの経路を操作し得るが、培養物中での生存期間が限定されており、一般に、約2週間以内に死滅する。従って、選択培地中で生存し得る細胞のみがミエローマおよびB細胞から形成されるハイブリッドである。

【0446】この培養は、特定のハイブリドーマが選択されるハイブリドーマの群を提供する。代表的には、ハイブリドーマの選択は、マイクロタイタープレートで単一のクローンの希釈により細胞を培養すること、次いで所望の反応性について (約2~3週後) 個々のクローン上清を試験することにより行われる。このアッセイは、例えば、ラジオイムノアッセイ、酵素免疫アッセイ、細胞障害性アッセイ、ブランクアッセイ、ドット免疫結合アッセイなどのように、感度が高く、簡単、かつ迅速であるべきである。

【0447】次いで、選択されたハイブリドーマは連続希釈され、そして個々の抗体産生細胞株中にクローニングされ、次いで、このクローンは、MAbを提供するために無限に増殖され得る。この細胞株は、MAb産生のために2つの基本的な方法で利用され得る。ハイブリドーマのサンプルは、最初の融合用の体細胞およびミエローマ細胞を提供するために用いられたタイプの組織適合

性動物に (しばしば腹腔に) 注入され得る。注入された動物は、融合された細胞ハイブリッドにより産生される特異的モノクローナル抗体を分泌する腫瘍を発生する。次いで、この動物の体液 (例えば、血清または腹水) は、高濃度でMAbを提供するために採取され得る。個々の細胞株はまたインビトロで培養され得、ここではMAbが高濃度で容易に得られ得る培養培地中に自然に分泌される。いずれかの手段により産生されるMAbは、所望であれば、過、遠心分離、および種々のクロマトグラフ法 (例えば、HPLCまたはアフィニティークロマトグラフィー) を用いてさらに精製され得る。

【0448】発明者らはまた、モノクローナル抗体を生成するために分子クローニングアプローチを使用することを意図する。このために、組み合わせ免疫グロブリンファージミドライブラリーは、免疫された動物の脾臓から単離されるRNAから調製され、そして適切な抗体を発現するファージミドは、抗原を発現する細胞およびコントロール細胞 (例えば、正常細胞対腫瘍細胞) を用いてパンニングすることにより選択される。このアプローチが従来のハイブリドーマ技術よりも有利な点は、1ラウンドで約 10^4 倍多くの抗体が産生およびスクリーニングされ得ること、および、HおよびL鎖の組み合わせにより新しい特異性が生じることであり、このことは適切な抗体を見出す機会をさらに増加させる。

【0449】本発明でMAbを用いる場合、これは、ヒト、マウス、サル、ラット、ハムスター、ニワトリ、またはさらにウサギ起源であり得る。本発明は、ヒト抗体、ヒト定常および/または可変領域ドメインを有するマウス、ラット、または他の種由来の「ヒト化」またはキメラ抗体、および他の組換え抗体ならびにこれらのフラグメントの使用を意図する。もちろん、調製の容易さおよび試薬の迅速な入手可能性のため、代表的にはマウスモノクローナル抗体が好ましい。

【0450】(2. 機能的抗体結合領域) 標的化剤抗体または抗体フラグメント (例えば、Fab', Fab, F(ab')₂, FvまたはscFv) の起源または由来は、二重特異性リガンドの調製に実際に用いられる抗体またはフラグメントが所望の結合特性を示す限りは、本発明の実施に特に重要であるとは考えられない。

【0451】Fc部分が除去されている抗体調製物を使用する必要がある得る。免疫グロブリン分子のフラグメント化は、制御されたタンパク質分解により達成され得るが、その条件は、種および免疫グロブリンクラスまたはサブクラスによりかなり変化する。2価F(ab')₂ フラグメントは、通常、1価FabまたはFab' フラグメントよりも好適である。

【0452】(Fab) Fabフラグメントは、非特異的チオールプロテアーゼであるパパインによる全免疫グロブリンのタンパク質分解より得られ得る。パパインは、まず、システイン、2-メルカプトエタノール、ま

たはジチオトレイトールを用いて活性部位におけるスルフィドリル (sulphydryl) 基を還元することにより活性化されなければならない。ストック酵素中の重金属は、最大酵素活性を確実にするためにEDTA (2mM) を用いるキレート形成により除去すべきである。酵素および基質は、正常には1:100の重量比で一緒に混合される。インキュベーション後、反応は、ヨードアセトアミドを用いるチオール基の不可逆的アルキル化によってまたは単に透析によって停止され得る。消化の完全性はSDS-PAGEによりモニターされるべきであり、そして種々の画分は、プロテインA-セファロースまたはイオン交換クロマトグラフィーにより分離されるべきである。

【0453】(F(ab')₂) ウサギおよびヒト起源のIgGからのF(ab')₂ フラグメントを調製するための通常の手順は、酵素ペプシン (プロトコル7.3.2) によるタンパク質分解により制限される。条件 (酢酸緩衝液中100×抗体過剰w/w、pH 4.5、37℃) は、抗体が重鎖間ジスルフィド結合のC末端側で切断されることを示唆する。マウスIgGの消化速度はサブクラスによって変化し得、そしていくつかの未消化または完全に分解されたIgGを含まない高収率の活性F(ab')₂ フラグメントを得ることは困難であり得る。特に、IgG_{2b} は完全な分解を非常に受けやすい。他のサブクラスは、最適な結果を生じるために異なるインキュベーション条件を必要とする。

【0454】ペプシンによるラットIgGの消化は、0.1M 酢酸緩衝液、pH 4.5中での透析、および次いで1%w/wペプシンとの4時間のインキュベーションを包含する条件を必要とし；IgG₁ およびIgG_{2a} の消化は、最初に0.1M ギ酸緩衝液、pH 2.8に対して4℃で16時間透析し、次いで酢酸緩衝液に対して透析する場合は改良される。IgG_{2b} では、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.8中、37℃にて4時間、スタフィロコッカスのV8プロテアーゼ (3%w/w) とインキュベーションすることによってさらに一貫した結果が得られる。

【0455】(3. 二重特異性抗体) 一般に、二重特異性抗体の調製もまた、Glennieら (1987) により例示されるように、当業者に周知である。二重特異性抗体は、例えば、ガン患者を処置するために (Bauerら、1991) 臨床的に用いられている。二重特異性抗体の調製の1つの方法は、一方は標的された腫瘍細胞抗原および他方は凝固剤 (または活性化抗原のような他の所望の標的) に特異性を有する抗体の別個の調製を包含する。

【0456】二重特異性抗体はまた、免疫療法剤としての使用のために特に開発されている。抗原誘発とともに初期に述べられているように、これらの抗体のいくつかはリンパ球と腫瘍抗原とを架橋するために開発された

(Nelson, 1991; Segalら、1992)。例としては、T細胞と、例えば、CD3において腫瘍抗原とを結合し、ならびに標的細胞に極めて接近してTCR/CD3複合体を物理的に架橋することによりリンパ球活性化を引き起こすキメラ分子を包含する (Staerzら、1985; Perezら、1985; 1986a; 1986b; Tingら、1988)。

【0457】実際に、ガン腫、リンパ腫、白血病、およびメラノーマの腫瘍細胞は、T細胞による二重特異性抗体媒介死滅を受けやすいことが報告されている (Nelson, 1991; Segalら、1992; deLeijら、1991)。これらのタイプの二重特異性抗体はまた、悪性の腫瘍標的に対していくつかの第I相臨床試験で用いられている。それらは本発明によれば新規な組成物ではないが、二重特異性架橋抗体を本明細書に記載される二重特異性凝固リガンドとともに組み合わせて使用することもまた意図される。二重特異性架橋抗体は、参考文献 (例えば、deLeijら (1991); Clarkら (1991); Rivoltiniら (1992); Bolhuisら (1992); およびNittaraら (1990)) に記載されるように投与され得る。

【0458】二重特異性抗体の調製について当該分野では多くの方法が公知であるが、Glennieら (1987) の方法は、2つの選択された抗体からの消化性F(ab')₂ フラグメントの調製、次いで別個のFab'γ_{SH} フラグメントを提供するためのそれぞれの還元を包含する。結合されるべき2つのパートナーのうちの1つにおけるSH基は、次いで、o-フェニレンジマレイミドのような架橋試薬でアルキル化されて、一方のパートナーにおいて遊離のマレイミド基を提供する。次いで、このパートナーは、チオエーテル結合によって他方に結合されて、所望のF(ab')₂ ヘテロ接合体を得る。

【0459】調製、高収量、および再現性の容易さのため、Glennieら (1987) の方法は、しばしば二重特異性抗体の調製に好適であるが、用いられ得るおよび発明者らにより意図される多くの他のアプローチがある。例えば、他の技術は公知であり、SPDPまたはプロテインAとの架橋が行われるか、あるいは三重特異性構築物が調製される (Titusら、1987; Tuttleら、1991)。

【0460】二重特異性抗体を産生する別の方法は、2つのハイブリドーマの融合によるクアドローマ (quadroma) の形成である (Flavellら、1991、1992; Pimmら、1992; Frenchら、1991; Embletonら、1991)。本明細書中で用いられる用語「クアドローマ」は、2つのB細胞ハイブリドーマの生産的融合を記載するために用いられる。現在の標準的技術を用いて、2つの抗体産生ハ

イブリドーマが融合されて娘細胞を得、そして次いで、両セットのクローン型の免疫グロブリン遺伝子の発現を維持したこれらの細胞が選択される。

【0461】クアドローマを生成する好ましい方法は、親ハイブリドーマの少なくとも1つの酵素欠損変異体の選択を包含する。次いで、この第1の変異体ハイブリドーマ細胞株が、例えば、ヨードアセトアミドに致死的に曝された、その継続した生存が妨げられる第2のハイブリドーマの細胞に融合される。細胞融合は、致死的に処理されたハイブリドーマから酵素欠損に関する遺伝子を獲得することによる第1のハイブリドーマのレスクュー、および第1のハイブリドーマへの融合による第2のハイブリドーマのレスクューを可能にする。同じイソ型であるが異なるサブクラスの免疫グロブリンの融合が、好ましいが、必要とされるわけではない。混合サブクラス抗体は、好ましいクアドローマの単離のための代替アッセイの使用を可能にする。

【0462】より詳細には、クアドローマ開発およびスクリーニングの1つの方法は、第1の選択MAbを分泌するハイブリドーマ株を得、そして必須代謝酵素であるヒポキサンチン／グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT）を欠損しているこの株を作製することを包含する。ハイブリドーマの欠損変異体を得るために、細胞を8-アザグアニンの漸増濃度（ $1 \times 10^{-7} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ）の存在下で増殖させる。変異体を限界希釈によりサブクローン化し、そしてヒポキサンチン／アミノプテリン／チミジン（HAT）感受性について試験する。培養培地は、例えば、10%FCS、2mM L-グルタミン、および1mMペニシリンーストレプトマイシンを補充したDMEMからなり得る。

【0463】第2の所望のMAbを産生する相補ハイブリドーマ細胞株は、標準的な細胞融合技術（Galfréら、1981）によるか、またはClarkら、（1988）により記載のプロトコルを用いることにより、クアドローマを生成するために用いられる。簡単にいえば、 4.5×10^7 個のHAT-感受性第1細胞を、致死用量の不可逆性の生化学的インヒビターであるヨードアセトアミド（リン酸緩衝化生理食塩水中5mM）で、融合前に、30分間氷上で前処理した 2.8×10^7 個のHAT-耐性第2細胞と混合する。細胞融合をポリエチレングリコール（PEG）を用いて誘導し、そして細胞を96ウェルマイクロ培養プレートに播種する。クアドローマをHAT含有培地を用いて選択する。二重特異性抗体含有培養物を、例えば、固相イソ型特異的ELISAおよびイソ型特異的免疫蛍光染色を用いて、同定する。

【0464】二重特異性抗体を同定するための1つの同定の実施態様では、マイクロタイタープレート（Falcon, Becton Dickinson Labware）のウェルが、親ハイブリドーマ抗体の1つと特

異的に相互作用し、かつ両抗体と交差反応性を有さない試薬でコートされる。プレートは洗浄され、ブロックされ、そして試験されるべき上清（SN）が各ウェルに添加される。プレートは室温で2時間インキュベートされ、上清は捨てられ、プレートは洗浄され、そして希釈アルカリホスファターゼ-抗抗体接合体が室温で2時間添加される。プレートは洗浄され、そしてホスファターゼ基質（例えば、p-ニトロフェニルリン酸（Sigma, St. Louis））が各ウェルに添加される。プレートはインキュベートされ、3N NaOHが各ウェルに添加されて反応を停止させ、そしてOD₄₁₀値がELISAリーダーを用いて測定される。

【0465】別の同定実施態様では、ポリ-L-リジンで前処理したマイクロタイタープレートが、標的細胞の1つを各ウェルに結合させるために用いられ、次いで細胞が、例えば、1%グルタルアルデヒドを用いて固定化され、そして二重特異性抗体が、それらの無傷細胞への結合能力について試験される。さらに、FACS、免疫蛍光染色、イディオタイプ特異的抗体、抗原結合競合アッセイ、および抗体特徴付けの分野において一般的な他の方法が、本発明と共に、好ましいクアドローマを同定するために用いられ得る。

【0466】クアドローマを単離した後、二重特異性抗体が他の細胞産物から精製される。これは、免疫グロブリン精製の当業者に公知の種々のタンパク質単離手順により達成され得る。抗体を調製および特徴付けする手段は、当該分野において周知である（例えば、★Antibodies: A Laboratory Manual, 1988を参照のこと）。

【0467】例えば、選択されたクアドローマからの上清が、プロテインAまたはプロテインGセファロースカラムに通され、IgGを結合する（イソ型に依存する）。次いで、結合された抗体が、例えば、pH5.0クエン酸緩衝液で溶出される。BsAbを含有する溶出画分が、等張緩衝液に対して透析される。あるいは、溶出液はまた、抗免疫グロブリンセファロースカラムに通される。次いで、BsAbが、3.5M塩化マグネシウムで溶出される。次いで、このようにして精製されたBsAbは、例えば、上記のように、イソ型特異的ELISAおよび標的細胞の免疫蛍光染色アッセイにより、結合活性について試験される。

【0468】精製BsAbおよび親抗体はまた、SDS-PAGE電気泳動を行い、続いて銀またはクマシーで染色することにより特徴づけおよび単離され得る。これは、親抗体の一方が他方より高い分子量を有する場合に可能である。その場合、BsAbのバンドは、2つの親抗体のバンド間の中間部に移動する。サンプルの還元は、2つの異なる見かけ分子量を有する重鎖の存在を確認する。

【0469】さらに、組換え技術が、一般に抗体の調製

のために、現在利用可能である。このことにより、所望の二重特異性を有する抗体をコードする組換え抗体遺伝子の調製が可能となる (Van Dukら、1989)。従って、最も好ましい結合特性を有するモノクローナル抗体を選択した後、これらの抗体に関するそれぞれの遺伝子が、例えば、ファージ発現ライブラリーの免疫スクリーニングにより、単離され得る (OiおよびMorrison, 1986; WinterおよびMilstein, 1991)。次いで、Fabコードドメインの再配列により、適切なキメラ構築物が容易に得られ得る。

【0470】(E. 結合アッセイ) 本発明は、動物およびヒト処置法 (regimen) において重要な有用性を有するが、これは、多くの他の実施用途もまた有する。これらの用途は、一般に、二重特異性化合物の特異的結合能に関連する。本発明の全ての化合物は、少なくとも1つの標的および結合成分 (例えば、抗体、リガンド、レセプターなど) を含むので、得られる二重特異性構築物は、本来の抗体、リガンド、またはレセプターなどが用いられ得る事実上全ての結合実施態様において用いられ得る。コアギュラントまたは他の結合領域の存在は、いずれの結合アッセイにおいても第1の結合領域の有用性を打ち消さない。

【0471】このようにして、二重特異性凝固リガンドは、標準的な結合アッセイにおいて用いられ得る。この結合アッセイとしては、例えば、免疫ブロット、ウェスタンブロット、および抗原が固体支持体マトリックス (例えば、ニトロセルロース、ナイロン、またはそれらの組合せ) 上に固定化されている他のアッセイが挙げられる。それらリガンドは、単に「抗体基質」として用いられ得るか、または標準的な二次試薬が許容不能に高いバックグラウンドを生じさせる抗原の検出で用いられる、より特異的な検出手段を提供するために用いられ得る。これは、研究される抗原がそれ自身免疫グロブリンであるか、または他の抗体がこの手順において用いられる (ELISAの場合において以下に例示する) 場合、特に有用である。

【0472】二重特異性結合リガンドはまた、解凍したばかりの組織塊およびホルマリン固定化パラフィン包埋組織塊の両組織塊と共に、免疫組織化学；蛍光活性化細胞選別、フローサイトメトリー、またはフローマイクロフルオロメトリー；複合体混合物から標的抗原を分離するための免疫沈降 (この場合、それらが分子格子を形成できるため、二次マトリックス結合試薬を用いなくても沈降を達成し得る)；抗原または細胞精製実施態様 (例えば、アフィニティークロマトグラフィー、特定の場では、1つまたはそれ以上の細胞集団の同時一工程高速精製さえも包含する)；および本明細書中に示される情報を与えられる当業者に公知の多くの他の結合アッセイにおいて、用いられ得る。

【0473】一例として、本発明の二重特異性リガンドは、ELISAアッセイにおいて用いられ得る。多くのタイプのELISAが知られており、そして当該分野において日常的に実施されている。二重特異性リガンドは、実施される特定のELISAタイプおよび検出されるべき「抗原」(成分)に依存して、いずれの結合工程においても用いられ得る。従って、リガンドは、プレートをコートするように用いられ得、抗原として結合部位に関して競合し得、一次結合リガンド、二次結合リガンド、または三次または他の結合リガンドとしてさえ標準曲線を作成し得る。以下に記載する代表的な様式をさらに考慮し、多くのELISA実施様式が当業者に公知である。

【0474】ELISAの1つの形態では、結合標的 (一般的に抗体自身である) が、ポリスチレンマイクロタイタープレートのウェルのような選択された表面、好ましくはタンパク質親和性を示す表面上に固定化される。洗浄して不完全に吸着した物質を除去した後、試験抗血清に関して抗原的に中性であると知られる非特異的タンパク質 (例えば、ウシ血清アルブミン (BSA)、カゼイン、または粉乳溶液) でアッセイプレートウェルを結合またはコートすることが望ましい。これは、固定化表面上の非特異的吸着部位のブロックを可能にし、従って表面上の抗血清の非特異的結合により引き起こされるバックグラウンドを低下させる。

【0475】これらのELISAタイプ (一般的にサンドイッチELISAと呼ばれる) において、プレート結合抗体は、抗原を「捕捉」するために用いられる。第1の抗体をウェルに結合させ、非反応性物質でコートしてバックグラウンドを低下させ、そして洗浄して非結合物質を除去した後、固定化表面は、本発明の代表的な実施態様において、免疫複合体 (抗原/抗体) 形成が導かれる様式で、検出および/または力価測定されるべき抗原性物質を含有する試験サンプルと接触される。これらの実施態様は、臨床サンプルまたは生体抽出液においてリガンドを検出するために、特に有用である。サンプルは、好ましくは、BSA、ウシγグロブリン (BG G)、およびリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS)、ならびに界面活性剤 (例えばTween) の溶液で希釈される。

【0476】次いで、重層した抗血清が、2〜4時間、好ましくは25〜37℃の目安の温度でインキュベートされる。インキュベーション後、抗血清接触表面は、非免疫複合物質を除去するように洗浄される。好ましい洗浄手順は、PBS/Tween、またはホウ酸緩衝液のような溶液を用いる洗浄を包含する。

【0477】結合抗原と試験サンプルとの間で特異的免疫複合体を形成し、続いて洗浄した後、免疫複合体形成の発生および量は、同じ複合体を二次特異的結合成分 (一般に抗体ベースの成分である) に供することにより

決定され得る。特定の実施態様では、本発明の二重特異性リガンドは、この工程において用いられるように提案されている。次いで、特異的結合工程および洗浄工程がさらに実施される。

【0478】本発明の代表的な実施態様において検出手段を提供するために、検出標識に結合されている第3の抗体が用いられる。検出標識としては、適切な色素原基質とインキュベートさせた際に発色を生じさせる結合酵素が挙げられる。第3のまたは三次の標識抗体は、二重特異性リガンドの一成分に対して結合親和性を有する。最終免疫複合体は、適切な結合工程および洗浄工程の後に、標識を検出することにより決定される。この標識の検出は、例えば、色素原基質とインキュベートすることにより行われる。色素原基質としては、例えば、尿素およびブロモクレゾールパープル、または2, 2'-アジノージー(3-エチルーベンズチアゾリン-6-スルホン酸[ABTS]および H_2O_2 が挙げられる。次いで、定量は、例えば、可視スペクトル分光光度計を用いて、発色の程度を測定することにより達成される。

【0479】上記のELISAタイプと共に、二次検出試薬として二重特異性凝固リガンドを用いることは、別個の利益を有する。例えば、そのことにより、通常標的される典型的な抗体定常領域とは異なる二重特異性リガンドの部分に特異的な三次の標識抗体の使用が可能になる。特に、二重特異性構築物の凝固部分(または凝固結合領域)に特異的である三次結合リガンドが用いられ得る。免疫複合体形成を検出するこの新規な手段は、サンドイッチELISAにおいて特に有用な改良特異性を与える。このサンドイッチELISAでは、三次抗体が、意図された二次抗体にちょうど結合するのではなく、プレートのコートするために用いられる本来の物質(すなわち、本来の抗体)と交差反応し、そして結合し得る。二重特異性リガンドの非抗体部分に対して、または新規な抗原結合領域に対してさえも標識三次成分を指向することにより、非特異的結合の問題および異例に高いバックグラウンドは回避される。

【0480】二重特異性リガンドのさらなる実施用途は、それらの凝固能を利用することにより明らかである。提案された全ての化合物は凝固を誘導し得るので、それらは、凝固を一成分として包含する任意のアッセイにおいて、例えば、コントロールとして用いられ得る。標的成分の存在は、このようなアッセイにおいて、他とは独立した各成分機能として、コアギュラントの有用性を打ち消さない。

【0481】(F. 組織因子結合二重特異性抗体の有効な用途) 初めの方で述べたように、組織因子(TF)は、血液凝固を開始させ得る1つの因子である。TFは、血管損傷において、または特定のサイトカインによる活性化後に、血液に曝される。次いで、利用可能なTFが、第VIIa因子と複合体を形成し、最終的にフィ

ブリン形成を生じる凝固カスケードを開始させる。

【0482】1つの代表的な実施態様において、本発明者らは、1つの抗原結合部位では腫瘍血管系内皮細胞上の抗原に対する特異性を有し、そして他方の抗原結合部位ではヒトTFの細胞外ドメインに対する特異性を有する二重特異性抗体を合成した。ヒトTFに対して特異性を有する抗体は、第VIIa因子複合体形成事象またはTF/VIIa活性を妨害することなく、高い親和性でTFに結合することが既に示された(Morrisseyら、1988)。全長ヒトTFを用いる代わりに、本発明者らは、短縮型(tTF)を用いた。この短縮型は、細胞質ドメインならびに膜貫通ドメインを欠く。短縮されたTFは、第VIIa因子と複合体を形成し得るが、凝固誘導活性を欠く。これはおそらく、凝固開始複合体(第X因子を含む)がアSEMBルし得る膜表面と、複合体を形成し得ないからである。

【0483】この腫瘍血管系内皮細胞表面特異的標的構築物の有効性を分析するために用いられるマウスモデルは、最近確立されたモデルであり、このモデルでは、MHCクラスII抗原(正常組織の血管系には存在しない)が、腫瘍細胞により分泌されるIFN- γ による誘導により、腫瘍血管系で発現される(Burrowsら、1992; BurrowsおよびThorpe、1993)。静脈内に投与された抗クラスII抗体は迅速かつ強く腫瘍血管系に局在化することが実証されている(Burrowsら、1992)。

【0484】本発明者らは、C1300(Mur)腫瘍生成マウスにおいて、抗MHCクラスII/抗TF二重特異性抗体が、tTFと共に投与される場合、腫瘍の血管系において特異的に凝固を誘導し得ることを、本明細書中において実証する。実際に、抗体:tTF複合体の静脈内投与は、腫瘍血管系の迅速な血栓症を誘導し、70%の動物で腫瘍退縮を完了した。二重特異性抗体単独、tTF抗体単独、tTF存在下または非存在下の任意のイソ型適合性コントロール抗体のいずれもが、同一の効果を誘起し得なかった。このことは、B21-2/10H10二重特異性抗体が、標的細胞およびtTFを架橋し得る「コアギュリガンド」として作用し、それによりtTFが第X因子を活性化し得、そして凝固カスケードを開始させ得ることを示している。これはまた、固形腫瘍の処置におけるコアギュリガンドの明らかな成功を示す。

【0485】(G. 薬学的組成物およびキット) 本発明の薬学的化合物は、一般に薬学的に受容可能なキャリアまたは水性媒体に溶解または分散した有効量の二重特異性凝固リガンドを包含する。

【0486】用語「薬学的に受容可能」または「薬理的に受容可能」は、動物またはヒトに、適切に投与されるとき、有害な、アレルギー性のまたはその他の不都合な反応を起こさない分子実体および組成物をいう。本明

細書中で用いられるように、「薬学的に受容可能なキャリア」としては、任意のおよびすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤、等張化剤 (isotonic agent) および吸収遅延剤 (absorption delaying agent) などが挙げられる。薬学的活性物質に対するこのような媒体および薬剤の使用は、当該分野で周知である。任意の従来の媒体または薬剤は、活性成分と適合しないものではない限り、本治療組成物中でのその使用が意図される。補助活性成分もまた、組成物に取り入れ得る。

【0487】(1. 非経口処方物) 本発明の二重特異性リガンドは、しばしば非経口投与のために処方される。例えば、静脈内、筋肉内、皮下または他のそのような経路を経る注射(腫瘍部位または疾病部位に直接点滴することを含む)のために処方される。活性成分として腫瘍標的化凝固剤を含有する水性組成物は、本発明の開示を考慮すれば当業者に理解される。代表的には、このような組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかのように注射可能なものとして調製され得る。注射前に液体を加えて溶液または懸濁液を調製するために用いられるのに適する固体の形態もまた、調製され得る。そして調製物はまた、乳化もされ得る。

【0488】遊離塩基または薬理学的に受容可能な塩のような活性化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースのような界面活性剤と適切に混合された水中で調製され得る。分散体はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物、ならびにオイル中で調製され得る。通常の保存および使用条件下では、これらの調製物は、保存剤を含有し微生物の成育を防止する。

【0489】注射用途に適した薬学的形態としては、無菌水溶液または分散体; ゴマ油、ピーナッツ油、または水性プロピレングリコールを含有する処方物; および無菌注射溶液または分散体の用時調製のための無菌粉末が挙げられる。すべての場合で、形態は、無菌でなければならず、容易にシリンジで利用できる程度まで流動的でなければならない。それは、製造および保存条件下で安定でなければならず、微生物(例えば、細菌類および真菌類)の混入作用に対して保護されなければならない。

【0490】二重特異性リガンドまたは抗体は、中性または塩の形態で組成物の中に処方され得る。薬学的に受容し得る塩は、酸付加塩(タンパク質の遊離アミノ基により形成される)を包含し、そしてこれは無機酸(例えば、塩酸またはリン酸)または有機酸(例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸など)により形成される。遊離カルボキシル基により形成される塩はまた、無機塩基(例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄)および有機塩基(例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなど)

から誘導され得る。

【0491】キャリアはまた、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、それらの適切な混合物、および植物油を含む溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用により、分散の場合には要求される粒子の大きさの維持により、および界面活性剤の使用により維持され得る。微生物の作用を防止することは、種々の抗細菌剤および抗真菌剤(例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなど)により達成され得る。多くの場合、等張化剤(例えば、糖または塩化ナトリウム)を含有することが好ましい。注射可能な組成物の吸収を延長することは、吸収を遅延する薬物(例えば、アルミニウムモノステアレートおよびゼラチン)の組成物中での使用で達成され得る。

【0492】無菌注射溶液は、適切な溶媒中の必要量の活性化化合物を、必要に応じて上に列挙した種々の他の成分と組み合わせ、続いて滅菌濾過を行うことにより調製される。一般に、分散物は、種々の滅菌された活性成分を、塩基性分散媒および上に列挙したもののうち必要とされる他の成分を含有する無菌ビヒクルの中に組み入れることにより調製される。無菌注射溶液の調製のための無菌粉末の場合、調製の好ましい方法は真空乾燥技術および凍結乾燥技術であり、それらの技法は、活性成分と付加的な所望の成分との粉末を、あらかじめ無菌濾過されたそれらの溶液から生成する。

【0493】処方されると、溶液は、投薬処方物に適合した方法および治療に効果のあるような量で、投与される。処方物は、種々の剤形(例えば、上記の注射溶液のタイプ)で容易に投与されるが、薬物放出カプセルなどもまた、用いられ得る。

【0494】本発明に従った適切な薬学的組成物は、一般に、予定される使用に応じて、受容し得る薬学的希釈剤または賦形剤(例えば、無菌水溶液)と混合して最終濃度の範囲にされた、ある量の二重特異性リガンドを含有する。調製技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Mack Publishing Company、1980(本明細書中で参考として援用される)により例示されるように当該分野で周知である。エンドキシン混入は、安全レベル(例えば、0.5 ng/mg タンパク質未満)で最小限に維持されるべきことが理解される。さらに、ヒト投与については、調製品は、FDA Office of Biological Standardsにより要求されるような無菌性、発熱性、一般安全性および純度標準を満たすべきである。

【0495】治療効果量は、本明細書中(例えば、実施例III参照)に詳述する研究で示されるように、動物

モデルを用いて容易に決定され得る。固形腫瘍を有する実験動物は、臨床環境に移される前に適切な治療用量を最適化するのに、よく用いられる。このようなモデルは、効果的な抗ガンストラテジーを予測するのに、非常に信頼性のあることが知られている。例えば、実施例 I I I で用いられるように、腫瘍を有するマウスは、前臨床試験で広く用いられる。

【0496】本発明者は、C1300 (M08) 腫瘍を有するマウスを用い、毒性限界、および最小限の毒性で至適な抗腫瘍効果を与える二重特異性の作用範囲を決定した。

【0497】ガンの処置においての使用のための有効量は、1週間あたり約1回の頻度でIVルートを経て投与される場合、約0.1 mg/kgと約2 mg/kgとの間、および好ましくは約0.8 mg/kgと約1.2 mg/kgとの間であると、現在のところ提示されている。処置される被験体の状態により、用量のいくらかの変化は必然的に生じる。投与に対して責任のある人は、いずれにしても、個々の患者に対して適切な用量を決定する。このような最適化および調整は、当該分野で日常的に行われ、そして決して過度の実験量を表さない。

【0498】本発明の一つの局面は、循環から内因性凝固因子を蓄積し、腫瘍部位内にそれを濃縮する、複合化していない二重特異性結合リガンドを投与することによる腫瘍部位への凝固剤の送達に関することに留意すべきである。これらの場合、用いられる薬学的組成物は、標的化領域およびコアギュラント結合領域を有するリガンドを含有するが、他の点では一般に上記のものと同じである。

【0499】非経口投与（例えば、静脈内注射または筋肉内注射）用に処方された化合物に加えて、他の薬学的に受容され得る形態（例えば、錠剤または他の経口投与のための固形物、時間放出 (time release) カプセル、リボソーム形態など）もまた意図される。処置される状態に応じて、他の薬学的処方物もまた用いられ得る。例えば、皮膚炎および乾癬のような病的状態を処置するために適切な局所処方物；および糖尿病性網膜症のための眼用処方物。

【0500】(2. 摂取可能な処方物) 特定の実施態様では、活性化合物は、経口投与され得る。このことは、消化酵素によるタンパク質分解に、一般に耐性の、または耐性となる薬剤について意図される。このような化合物は、化学的に設計または修飾された薬剤；右旋性ペプチジル薬剤；リボソーム処方物；およびペプチダーゼ分解およびリパーゼ分解を避けるために時間放出カプセルに入った処方物を包含することが意図される。

【0501】経口投与のために、活性二重特異性化合物は、例えば不活性希釈剤または消化され得る食用キャリアと共に投与され得る。あるいは、それらは、堅いまたは軟らかいシェルのゼラチンカプセル内に封入される

か、あるいは錠剤として圧縮されるか、あるいは食餌内に直接組み入れられる。経口治療投与のために、活性化化合物は、賦形剤に組み入れられ、そして摂取し得る錠剤、舌下錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、カシェ剤 (wafer) などの形態で用いられる。このような組成物および調製物は、少なくとも0.1%の活性二重特異性コアギュラントを含有すべきである。組成物および調製物の割合は、当然変化し得、好ましくはユニットの重量の約2%~約60%の間であり得る。このような治療に有用な組成物中の活性化化合物の量は、適切な用量が得られるような量である。

【0502】錠剤、トローチ、丸剤、カプセルなどは、また：結合剤（例えば、ゴムトラガカント、アラビアゴム、コーンスターチ、またはゼラチン）；賦形剤（例えば、リン酸ジカルシウム）；崩壊剤（例えば、コーンスターチ、ポテトスターチ、アルギン酸など）；滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム）を含有し得、そして甘味料（例えば、スクロース、ラクトース、またはサッカリン）または香料（例えば、ペパーミント、冬緑油、またはチェリー香料）が添加され得る。用量単位形態がカプセルの場合、上記のタイプの材料に加えて液体キャリアが含有され得る。

【0503】種々の他の材料は、コーティングとして、またはそれ以外に用量単位の物理的形態を改変するように存在し得る。例えば、錠剤、丸剤、またはカプセルは、シェラック、糖またはその両方でコートされ得る。エリキシル剤のシロップは、活性化化合物、甘味料としてのスクロース、保存剤としてのメチルパラベンおよびプロピルパラベン、染料、および香料（例えば、チェリー香料またはオレンジ香料）を含有し得る。当然、任意の用量単位形態の調製に用いられる任意の材料は、薬学的に純粋で、用いられる量で実質的に無毒であるべきである。さらに、活性化化合物は、持続放出調製物および処方物に組み入れられ得る。

【0504】(3. リボソーム処方物) 本発明の二重特異性凝固リガンドはまた、所望であれば、リボソーム調製物として処方され得る。以下の情報は、本発明のコアギュラントを組み入れたリボソーム処方物の製造において利用され得る。リン脂質は、水に分散された場合、脂質と水のモル比に依存してリボソームを形成する。リボソームの物理的特性は、pH、イオン強度および二価カチオンの存在に依存する。リボソームは、イオン性物質および極性物質に対して低い浸透性を示すが、高温において相転移して、これによりその浸透性が著しく変わる。相転移は、ゲル状態として知られる密に充填された秩序ある構造から、流体状態として知られるゆるく充填されたあまり秩序のない構造への変化を意味する。この相転移は、特有の相転移温度で起こり、イオン、糖および薬物に対する浸透性の増加を生じる。

【0505】温度に加えて、タンパク質に曝されること

で、リボソームの浸透性は、変わり得る。特定の可溶タンパク質（例えば、シトクロームc）は、二重層に結合し、変形させ、そして貫入し、それにより浸透性の変化を引き起こす。コレステロールは、見かけ上リン脂質をさらに堅密に充填することにより、タンパク質のこの貫入を阻害する。本発明での使用について最も有用なリボソーム形成は、コレステロール、またはPEGさえ含有することは、意図される。

【0506】溶質をトラップする能力は、異なるタイプのリボソームの間で変化する。例えば、多層ベシクル（MLV）は、溶質をトラップすることにおいて適度に効果があり、小さな単層ベシクル（SUV）は、十分ではない。SUVは、サイズ分布において均一性および再現性の点で有利であるが、サイズとトラップ効率との間の妥協（compromise）は、大きい単層ベシクル（LUV）により示される。これらは、エーテルエバポレーションにより調製され、そして溶質トラップにおいて、MLVより3〜4倍効果がある。

【0507】リボソーム特性に加えて、化合物のトラップにおける重要な決定因子は、化合物自体の物理化学的性質である。極性化合物は、水性空間でトラップされ、そして非極性化合物は、ベシクルの脂質二重層に結合する。極性化合物は、浸透によりまたは二重層が破壊されたときに遊離されるが、非極性化合物は、二重層が温度またはリボタンパク質への曝露により破壊されない限り、二重層と結びついたままである。両方のタイプとも、相転移温度において最大外向き流出速度（efflux rate）を示す。

【0508】リボソームは、以下の4つの異なるメカニズムを経て、細胞と相互作用する：網内系の食細胞（例えば、マクロファージおよび好中球）によるエンドサイトーシス；非特異的な弱い疎水性の力または静電力、あるいは細胞表面成分との特異的な相互作用のどちらかによる細胞表面への吸着；リボソームの脂質二重層の細胞質膜への挿入による細胞質膜との融合（細胞質の中へのリボソーム内容物の同時放出を伴う）；およびリボソーム内容物との任意の会合なしでのリボソーム脂質の細胞膜または細胞下（subcellular）膜への転移、あるいはその逆による。どのメカニズムが作用し、そして1つより多くのメカニズムが同時に作用するかどうかを決定することは、しばしば困難である。

【0509】静脈内に注射されたリボソームの成りゆき（fate）および性質は、それらの物理的性質（例えば、大きさ、流動性、および表面電荷）に依存する。それらは、それらの組成に依存して、数時間から数日間、組織に残存し、そして血中での半減期は、数分から数時間の範囲である。より大きいリボソーム（例えば、MLVおよびLUV）は、網内系の食作用細胞により速やかに取り込まれるが、循環系の生理学が、大部分の部位でこのような大きな種の排出（exit）を制限する。そ

れらは、毛細管内皮（例えば、肝臓または脾臓の洞様血管）に存在する大きな開口部または孔においてのみ排出され得る。従って、これらの器官は、取り込みの主要部位である。一方、SUVは、より広い組織分布を示すが、なお肝臓および脾臓中に高度に隔離（sequester）される。一般に、このインビボでの性質は、リボソームの大きいサイズを受け入れやすい器官および組織のみへのリボソームの集中を決定する。これは、明らかに血液を含んでいるので、このことは、それらの本発明と組み合わせた使用の限定とはならない。

【0510】他の実施態様では、本発明の二重特異性成分は、リボソーム表面と混合され得、薬物内容物を、標的細胞表面上に位置する特異的抗原レセプターに導く。炭水化物決定因子（細胞-細胞間の認識、相互作用、および付着において役割を有する糖タンパク質または糖脂質細胞表面成分）もまた、認識部位として用いられ得る。なぜならそれらは、リボソームを特定の細胞タイプに導く能力があるからである。主として、リボソーム調製物の静脈内注射が用いられるが、他の投与経路もまた考え得ることは意図されている。

【0511】（4．局所処方物）局所使用のための二重特異性コアギュラントの処方物、例えば、クリーム、軟膏およびゲルとしての処方物もまた意図される。油性または水溶性軟膏基剤の調製物もまた、当業者に周知である。例えば、これらの組成物としては、植物油、動物性脂肪、およびさらに好ましくは石油から得られた半固体炭水化物が挙げられ得る。用いられる特定の成分としては、白色軟膏、黄色軟膏、セチルエステルワックス、オレイン酸、オリーブ油、パラフィン、ワセリン、白色ワセリン、鯨ロウ、スターチグリセリン剤、白色ワックス、黄色ワックス、ラノリン、無水ラノリン、およびグリセリルモノステアレートが挙げられ得る。

【0512】種々の水溶性軟膏基剤もまた用いられ得、例としては、グリコールエーテルおよびその誘導体、ポリエチレングリコール、ステアリン酸ポリオキシシル40、およびポリソルベートが挙げられる。所望であれば、皮膚を通しての送達すら、例えば、経皮パッチ、イオン浸透療法、または電気移送（electrotransport）により、用いられ得る。

【0513】（5．眼用処方物）本発明の二重特異性凝固リガンドはまた、眼用溶液としての使用に適した薬学的組成物に処方され得る。このような眼用溶液は、例えば、糖尿病性網膜症の処置において重要である。従って、糖尿病性網膜症の処置のために、本発明の二重特異性接合体は、治療を必要とする被験者の目に、従来の薬学的な慣行（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版、1488〜1501頁（Mack Publishing Co., Easton, PA））に従って調製された眼用調製物の形態で投与される。

【0514】眼用調製物は、新規の二重特異性コアグulantまたはその薬学的に受容可能な塩を、薬学的に受容可能な溶液、懸濁液、または軟膏中において、約0.01重量%～約1重量%、好ましくは約0.05重量%～約0.5重量%の濃度で含有する。いくらかの濃度の変化は、用いる特定の化合物、処置される被験体の状態などにより、必然的に生じる。そして、処置の責任者は、個別の被験体について最も適した濃度を決定する。眼用調製物は、好ましくは無菌水溶液の形態であり、所望であれば、付加的な成分（例えば、保存剤、緩衝剤、張度調節剤、抗酸化剤および安定剤、非イオン性湿潤剤または清澄剤、増粘剤など）を含有する。

【0515】このような溶液中での使用に適した保存剤としては、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、クロロブタノール、チメロサルなどが挙げられる。適切な緩衝剤としては、ホウ酸、重炭酸ナトリウムおよび重炭酸カリウム、ホウ酸ナトリウムおよびホウ酸カリウム、炭酸ナトリウムおよび炭酸カリウム、酢酸ナトリウム、二リン酸ナトリウムなどが挙げられ、pHを約6～8の間、好ましくは約7～7.5の間に維持するに十分な量である。適切な張度調節剤は、デキストラン40、デキストラン70、デキストロース、グリセリン、塩化カリウム、プロピレングリコール、塩化ナトリウムなどであり、眼用溶液の塩化ナトリウム当量は、 $0.9 \pm 0.2\%$ の範囲である。

【0516】適切な抗酸化剤および安定剤としては、重亜硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、チオ亜硫酸ナトリウム、チオ尿素などが挙げられる。適切な湿潤剤および清澄剤としては、ポリソルベート80、ポリソルベート20、ポロキサマー282、およびチロキサポールが挙げられる。適切な増粘剤としては、デキストラン40、デキストラン70、ゼラチン、グリセリン、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルプロピルセルロース、ラノリン、メチルセルロース、ワセリン、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースなどが挙げられる。眼用調製物は、従来の方法（例えば、点眼液の形態でまたは眼用溶液中に目を浸すことにより）により治療が必要とされる被験体の目に、局所的に投与される。

【0517】（6. 治療キット）本発明はまた、本明細書中で記載された二重特異性凝固リガンドを含む治療キットを提供する。このようなキットは、一般に、本発明に従う少なくとも一つの二重特異性リガンドの薬学的に受容可能な処方物を、適切な容器手段中に含有する。キットはまた、以下のものを含有し得る：他の薬学的に受容可能な処方物（例えば、一般に異なる標的成分を有するさらなる二重特異性凝固リガンドを含有する処方物）；複合化されていない余分の凝固因子；二重特異性抗体、T細胞、または例えば抗原誘導で用いられる他の

機能成分；抗原抑制で用いられる成分（例えば、シクロスポリン）；異なる抗腫瘍部位の抗体またはイムノトキシン；および1つ以上の一連の（a range of）化学療法薬剤。

【0518】組み合わせキットで用いられる好ましい薬剤としては、疾患関連血管内皮細胞を誘導して、標的化可能な抗原（例えば、E-セレクトインまたはMHCクラスII抗原）を発現し得る薬剤が挙げられる。誘導剤としては、疾患抗原または腫瘍抗原に結合し、そしてIFN- γ を産生するT細胞クローンが挙げられ得る。好ましい誘導剤としては、疾患細胞抗原または腫瘍細胞抗原、ならびにサイトカインの同化により標的抗原発現を誘導し得るエフェクター細胞と結合する二重特異性抗体が挙げられる。

【0519】このように、さらに本発明は、適切な容器手段中に以下を含有するキットを包含する：エフェクター細胞表面（すなわち、単球/マクロファージ、マスト細胞、T細胞、またはNK細胞）上の活性化抗原、および疾患細胞の細胞表面上の抗原に結合する二重特異性抗体を含有する第1の薬学的組成物；および、二重特異性リガンドを含む第2の薬学的組成物。この二重特異性リガンドは、活性化エフェクター細胞またはそれからのサイトカインにより誘導される内皮細胞抗原に結合する第1結合領域を含み、ここでのこの第1結合領域は、凝固因子または凝固因子に結合する第2結合領域と作動可能に連結している。

【0520】活性化抗原CD14、CD16（IgEについてはFcR）、CD2、CD3、CD28またはT細胞レセプター抗原に結合する二重特異性抗体を含有する第1の薬学的組成物を含むキットが好ましく、CD14結合二重特異性抗体またはCD28結合二重特異性抗体を含有する第1の薬学的組成物を含むキットがさらに好ましい。CD14またはCD16の結合を経た単球/マクロファージまたはマスト細胞の活性化は、E-セレクトインを誘導するIL-1産生を生じ、他方、CD2、CD3、またはCD28の結合を経たT細胞の活性化は、MHCクラスIIを誘導するIFN- γ 産生を生じる。従って、E-セレクトインまたはMHCクラスII抗原に結合する第1結合領域を含む、二重特異性リガンドを含有する、第2の薬学的組成物を含むキットもまた好ましい。

【0521】キットは、任意の追加の成分があってもなくても二重特異性凝固リガンドを含有する単一の容器手段を有し得る。あるいは、キットは、それぞれの所望される薬剤に対して異なる容器手段を有し得る。二重特異性凝固リガンドを生成するのに必要な別々の成分を含むキットもまた意図される。

【0522】キットの成分が1つ以上の液体溶液として供給されるとき、その液体溶液は水溶液であり、無菌水溶液が特に好ましい。しかし、キットの成分は、乾燥粉

末として供給され得る。試薬または成分が乾燥粉末として供給されるとき、粉末は、適切な溶媒の添加により再構成される。溶媒もまた、他の容器手段中で供給され得ることは想像される。

【0523】キットの容器手段としては、一般に、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、瓶、シリンジまたは他の容器手段が挙げられ、その中に二重特異性凝固リガンドおよび他の所望される薬剤が入れられ得、好ましくは適切に小分けされる。追加の成分が含有される場合、キットはまた、一般に第2のバイアルまたは他の容器を有し、追加の成分はその中に入れられ、別々に計画された用量の投与を可能にする。キットは、無菌の薬学的に受容可能な緩衝剤または他の希釈剤を含有するための第2/第3の容器手段もまた含有し得る。

【0524】キットはまた、二重特異性リガンドを動物または患者に投与する手段（例えば、1つ以上の針またはシリンジ、あるいは点眼容器、ピペット、あるいは同様の器具）を有し、それにより処方物が動物内に注入され得、または身体の疾患領域に適用され得る。本発明のキットはまた、代表的には、バイアルなどおよび他の成分を市販のための密閉するための手段（例えば、所望のバイアルおよび他の器具を入れて保存する、射出成型またはブロー成型プラスチック容器）を含み得る。

【0525】以下の実施例は、本発明の好ましい実施態様を説明するために包含される。以下の実施例において開示された技術が、本発明者により発見され、本発明の実施において良好に作用する技術を表し、従ってその実施についての好ましい様式を構成すると考えられることは、当業者により理解されるべきである。しかし、当業者は、本発明の真意および範囲から逸脱することなしに、多くの改変が開示された特定の実施態様においてなされ得、同様の結果を得ることは、本発明の開示を考慮して理解すべきである。

【0526】本発明において、特定の血液凝固の達成に使用される種々の組成物および方法が開示されている。これは、二重特異性抗体を用いたコアギュラントの部位特異的送達による、腫瘍の退行を引き起こす特定のインビボにおける腫瘍血管系の凝固によって例示される。

【0527】以下の図面は本明細書の一部をなすものであり、本発明の特定の局面を更に説明するために添付されている。本発明は、これら図面のうち一つ以上を本明細書に記載した具体的な実施例の詳細な説明とともに参照することにより、よりよく理解され得るであろう。

【0528】

【実施例】（実施例I）

（二重特異性凝固抗体の合成）本実施例は、腫瘍部位にコアギュラントを特異的に導き得る二重特異性抗体（すなわち、「コアギュリガンド」）の合成を記載する。

【0529】（A. 材料および方法）

（1. 試薬）ペプシン（A; EC 3. 4. 23.

1）、E11man試薬（ER; 5, 5'-ジチオービス（2-ニトロ安息香酸、DNTB）、2-メルカプトエタノール（2-ME）、亜硫酸ナトリウム（NaAsO₂）、およびウサギ脳トロロンボプラスチン（アセトン粉末）を、Sigma Chemical Co., St. Louis MO. から得た。Sephadex G-25およびG-100を、Pharmacia LKB (Piscataway, NJ) から得た。

【0530】（2. ヒト短縮型組織因子（tTF））組換えヒト短縮型TF（tTF）を、2つの異なる方法の1つを用いて調製した。

【0531】方法I: E. coli 発現ベクターの構築。tTF（残基1~218）をコードするcDNAを、cDNAの上流のトロニン切断部位に対するコード領域の添加を可能にするプライマー5'-GAAGAAGGGATCCTGGTGCCTCGTGGTTCTGGCACTACAAATACT-3'（5'-プライマー; 配列番号28）および5'-CTGGCCTCAAGCTTAACGGAATTTCACCTTT-3'（3'-プライマー; 配列番号29）を用いるPCRにより増幅した。PCR産物を、BamHIおよびHindIIIを用いて切断し、発現ベクターpTrcHisC (Invitrogen) のBamHIおよびHindIII部位の間に連結した。

【0532】DH5α細胞を連結混合物で形質転換し、そしてアンピシリンの存在下での選択の後に組換えプラスミドを単離した。E. coli 株BL21を、組換えプラスミドpTrcHisC-tTFを用いて形質転換し、そして得られた形質転換体をタンパク質発現に用いた。方法I: E. coli からのtTFの発現、再折畳み、および精製。ポリ(his)-tTF融合タンパク質を、pTrc-HisC-tTFで形質転換したBL21細胞を用いて発現させた。接種培養物（LB培地中10ml）を、37℃にて振盪しながら一晩増殖させた。

【0533】接種培養物を増殖培地に添加し、次いでこれを37℃にて振盪しながら増殖させた。550nmの吸光度が約0.5に達した場合、10mlの100mMイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシドを添加した。振盪を、37℃にて約20時間（定常期まで）続けた。

【0534】細胞を、遠心分離（10,000×g、20分間）により回収し、そしてインクルージョンボディを以下のように単離した（試薬の量は、細胞ペースト1グラムあたりである）。細胞ペーストを、4mlの10mM Tris (pH7.5)、150mM NaCl、1mM MgCl₂、0.17mg/ml PMSF、2mg/ml ニワトリ卵白リゾチーム (Sigma) に懸濁した。ベンゾナーゼ（250単位、EM Science）を添加した懸濁物を、室温にて1.5時

間、緩やかに混合し、次いで12,000gにて15分間遠心分離した。

【0535】ペレットを、10mM Tris (pH 7.5)、1mM EDTA、3%NP40 (2ml) 中に再懸濁し、50%の力で1分間超音波処理し、そして12,000×gにて20分間遠心分離した。ペレットを水中に再懸濁し、50%の力で20～30秒間超音波処理し、そして12,000×gにて20分間遠心分離した。水洗を繰り返し、最終的なペレット（インクルージョンボディーが非常に多い）を6M 塩化グアニジウム、0.5M NaCl、20mMリン酸、10mM β-メルカプトエタノール、pH8.0（1gインクルージョンボディーあたり9mlの）中に、室温にて一晚、緩やかに混合することにより懸濁した。

【0536】懸濁物を、12,000×gにて20分間遠心分離し、そして上清をニッケルニトリロ酢酸（Ni-NTA, Qiagen）カラムに載せた。カラムを、同じ6M 塩化グアニジウム緩衝液pH8、次いでpH7を用いて連続的に洗浄し、次いでpHを4まで減少させることによりタンパク質を溶出させた。

【0537】融合タンパク質を含有するNi-NTAカラム画分を合わせ、そしてジチオトレイトールを50mMに添加した。溶液を、室温にて一晚保持し、次いで6M尿素、50mM Tris、0.02%アジ化ナトリウム（pH8.0）中に約1mg/mlのタンパク質濃度に希釈し、そして同じ緩衝液の10～20容量に対し

5' プライマー - 5' GTC ATG CCA TGG CCC TGG TGC CTC GTG CTT
CTG GCA CTA CAA ATA CT

3' プライマー - 5' TGA CAA GCT TAT TCT CTG AAT TCC CCC TTT CT
(配列番号 2)

下線を付した配列は、tTFのN末端およびC末端をコードする。5' プライマーの残りの配列は、発現ベクターへのtTFのクローン化を可能にするNcoIの制限部位であり、そしてトロニンに対する切断部位をコードする。3' プライマーの配列は、発現ベクターにtTFをクローン化するためのHindIII部位である。PCR増幅を、製造者により提案されるように行った。簡略には、75μM dNTP；0.6μMプライマー、1.5mM MgCl₂を用いて、95℃にて30秒間、55℃にて30秒間、および72℃にて30秒間の30サイクルを行った。

【0541】方法II. ベクター構築。E. coli発現ベクターH₆pQE-60を、tTF（Leeら, 1994）発現のために用いた。PCR増幅したtTF cDNAを、NcoI部位とHindIII部位との間に挿入した。H₆pQE-60は、発現されるタンパク質がN末端に（His）₆配列を有するように組み込まれた（His）₆コード配列を有し、このタンパク質は

て4℃にて透析した。緩衝液を、2M 尿素、50mM

Tris、300mM NaCl、2.5mM 還元グルタチオン、0.5mM 酸化グルタチオン、0.02%アジ化ナトリウム（pH8.0）（折畳み緩衝液）に変えた。透析をさらに2日続け、緩衝液を新鮮な折畳み緩衝液に交換し、そして透析をさらに2日続けた。

【0538】次いで、溶液を20mM TEAに対して十分に透析し、透析バッグから取り出し、ヒトトロニン（約500部組換えタンパク質あたり1部（w/w））で室温にて一晚処理し、そしてHR-10/10 mono-Q陰イオン交換カラムに載せた。tTFタンパク質を、30分間にわたって、0～150mMまで直線的に濃度が増加するNaClを含有する20mM TEA緩衝液（流速3ml/分）を用いて溶出した。

【0539】方法II: tTF相補DNA（cDNA）の調製。J-82細胞（ヒト膀胱ガン）由来のRNAを、tTFのクローン化に用いた。全RNAを、GlassMaxTM RNAマイクロ単離試薬（Gibco BRL）を用いて単離した。RNAを、GeneAmp RNA PCRキット（Perkin Elmer）を用いてcDNAに逆転写した。tTF cDNAを、同じキットで、以下の2つのプライマーで増幅した：

【0540】

【表7】

Ni-NTAカラムで精製し得る。

【0542】方法II. tTF精製。tTFを含有するH₆pQE-60DNAを、E. coli TG-1細胞に形質転換した。細胞を、OD₆₀₀=0.5まで増殖させ、そしてIPTGを30μMまで添加し、tTF産生を誘導した。細胞を、30℃にて18時間振盪した後に回収した。細胞ペレットを、6M Gu-HClにおいて変成し、そして溶解物をNi-NTAカラム（Qiagen）に載せた。結合したtTFを、6M尿素で洗浄し、そして6M～1Mの尿素のグラジエントを用いて室温にて16時間再折畳みさせた。カラムを、洗浄緩衝液（0.05M NaH₂PO₄、0.3M NaCl、10%グリセロール）で洗浄し、そしてtTFを、洗浄緩衝液中の0.2M イミダゾールで溶出させた。

【0543】溶出したtTFを濃縮し、そしてG-75カラムに載せた。tTFモノマーを回収し、そしてトロニンで処理してH₆ペプチドを除去した。これは、500部のtTF（w/w）に対して1部のトロニン

(Sigma)を添加することにより、室温にて18時間行った。混合物をベンズアミジンSephrose 6Bトロンビンアフィニティークラム(Pharmacia)に通過させることにより、トロンビンをtTFから除去した。

【0544】tTFは、第VIIa因子に結合し、および第VIIa因子の触媒活性(Rufetら、1991)を増強する酵母またはチャニーズハムスター卵巣細胞由来の組換えtTFと同一の能力を有した。ドデシル硫酸ナトリウム中のポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した場合、これは、約24kDの分子量を有する単一成分として移動した。

【0545】(3. モノクローナル抗体) B21-2 (TIB-229)ハイブリドーマおよびSFR8-B6ハイブリドーマ(HB-152、以下SFR8と称する)を、ATCCから得た。両方のハイブリドーマは、ラットIgG2b抗体を分泌し、これを培養上清からプロテインGアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。B21-2抗体は、A-20細胞ならびにBALB/c/nu/nuマウス中に増殖したC1300 (Mure)トランスフェクタント腫瘍の血管系上に発現されるI-A^d抗原と反応する。SFR8抗体は、HLA-Bw6エпитープに対して指向し、そしてB21-2抗体に対するイソタイプのマッチしたネガティブコントロールとして供する。

【0546】TF9/10H10(10H10と称する)であるマウスIgG1は、TF/第VIIa因子活性を妨害することなくヒトTFと反応性であり、そしてMorrisseyら(1988)に記載のように産生した。

【0547】細胞株MRC OX7(OX7と称する)を、A. F. Williams博士(MRC Cellular Immunology Unit, University of Oxford, Oxford, England)から得た。これは、Tリンパ球上のThy 1.1抗原を認識する、マウスIgG1抗体OX7抗体を分泌した。これを、TF9/10H10に対するネガティブコントロールにマッチしたイソタイプとして用いた。

【0548】全ての抗体を、培養上清からプロテインGアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

【0549】(4. 二重特異性抗体の合成) F(ab')₂フラグメントを、それぞれのIgGを2%(w/v)ペプシンで37℃にて5~9時間消化し、そしてフラグメントをSephadex G100クロマトグラフィーにより精製することにより得た。二重特異性抗体B21-2/10H10、SFR8/10H10、およびB21-2/OX7の合成を、微小な改変を加えたBrennanら(1985)の方法に従って実行した。

【0550】二重特異性抗体B21-2/10H10、SFR8/10H10、OX7/10H10、およびB21-2/OX7を、微小な改変を加えたBrennanら(1985)の方法に従って合成した。簡略には、F(ab')₂フラグメントを、IgG抗体からペプシンでの消化により得、そしてクロマトグラフィーSephadex G100により均一に精製した。F(ab')₂フラグメントを、1mM EDTA(PBSE緩衝液)および9mM NaAsO₂を含有する0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8)中の5mM 2-メルカプトエタノールを用いて20℃にて16時間還元した。E11man試薬(ER)を、25mMの最終濃度になるように添加し、20℃にて3時間後、E11man誘導Fab'フラグメント(Fab'-ER)を、PBSEにおいてSephadex G25のカラム条で未反応ERから分離した。

【0551】二重特異性抗体を形成させるために、1つの抗体に由来するFab'-ERを、限外濾過セル中に約2.5mg/mlまで濃縮し、そして10mM 2-メルカプトエタノールを用いて20℃にて1時間還元した。得られたFab'-SHをPBSEにおいてSephadex G25のカラムを通して濾過し、そして第2の抗体から調製した等モル量のFab'-ERと混合した。混合物を、限外濾過により約3mg/mlまで濃縮し、そして20℃にて16時間攪拌した。反応産物をSephadex G100のカラムで分画し、そして二重特異性抗体(110kDa)を含有する画分を1mg/mlに濃縮し、そして0.02%アジ化ナトリウム中で4℃にて貯蔵した。

【0552】(B. 結果)

(1. 二重特異性抗体の分析) F(ab')₂フラグメントおよび二重特異性調製物の分子量を、Pharmacia LKB-Phastsystem(Pharmacia LKB, Piscataway, NJ)を用いる4~15%グラジエントゲルでのSDS-Page電気泳動により決定した。二重特異性ならびにホモダイマー対ヘテロダイマーの%を、FACS分析により決定した(実施例II)。

【0553】SDS-Page電気泳動による(およびFACS、実施例IIによる)二重特異性抗体の分析は、B21-2/10H10二重特異性が、いずれかの起源の4%未満のホモダイマーおよび140kDまたは55kDの分子量を有する、<10%フラグメントを含有することを示した。調製物の約10%は、おそらく(いずれかの起源の)超軽鎖と付着したF(ab')₂構築物である140kDフラグメントよりなった。

【0554】(実施例II)

(凝固抗体結合およびインビトロでの機能) 本実施例は、凝固抗体(コアギュリガンド)の二重特異性を示し、そして特異的結合、細胞送達、および凝固がコアギ

ュリガンドを用いてインビトロで達成されることを示す。

【0555】(A. 材料および方法)

(1. 細胞) A20細胞株(これは、I-A^d ポジティブBALB/c B細胞リンパ腫である)を、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC; Rockville, MD; TIB-208)から購入した。A20細胞を、10%(v/v) ウシ胎児血清(FCS)、0.2mM L-グルタミン、200単位/ml ペニシリンおよび100μg/ml ストレプトマイシン、18mM HEPES、0.1mM 非必須アミノ酸混合物、および1mM ビルビン酸ナトリウムを補充したDMEM(この培地を、以下完全DMEM培地と称する; 全ての試薬をLife Technologies, Gaithersburg, MDから得た)中で増殖させた。2-MEを、A20細胞に対して0.064mMの最終濃度で完全DMEMに添加する。培養物を、90%空気/10%CO₂の加湿雰囲気中において37℃にて維持した。

【0556】J82(TFを発現するヒト胆嚢ガン)を、ATCC(HTB-1)から得た。細胞は、完全DMEM中で付着して増殖した。

【0557】C1300神経膠腫細胞株を、自然発症腫瘍(これは、A/Jaxマウス(Dunham&Stewart, 1953)中で生じた)から樹立した。C1300(Mur)12株(以下、C1300(Mur)と称する)は、IFN- γ 発現レトロウイルスpSVX(Mur Δ As)(Watanabeら, 1989)を用いるマウスIFN- γ 遺伝子を有するC1300神経膠腫細胞のトランスフェクションに由来した。IFN- γ 発現レトロウイルスを、Dr. Y. Watanabe(Department of Molecular Microbiology, Kyoto University, Japan)から得た。

【0558】C1300(Mur)12細胞を、10%(v/v) ウシ胎児血清(FCS)、2.4mM L-グルタミン、200単位/ml ペニシリン、100μg/ml ストレプトマイシン、100μM 非必須アミノ酸、1μM ビルビン酸ナトリウム、18μM HEPES、および1mg/ml G418(Geneticin; Sigma)を補充したDulbeccoの改変Eagle培地(DMEM)中で維持した。培養物を、90%空気/10%CO₂の加湿雰囲気中で37℃にて維持した。

【0559】Thy 1.1-発現AKR-AマウスTリンパ球細胞株を、Dr. I. MacLennan教授(Department of Experimental Pathology, Birmingham University, Birmingham, England)から得て、そして完全DMEM中で増殖させた。

【0560】(2. 間接的免疫蛍光) A20細胞を、PBS/0.2% BSA/0.02% Na-アジド(以下、FACS緩衝液と称する)中に4×10⁶細胞/mlで再懸濁した。J82細胞を、PBS/EDTA(0.2% w/v)を用いてフラスコから穏やかな条件下で放出させ、そしてFACS緩衝液中に4×10⁶細胞/mlで再懸濁した。50μlの細胞懸濁物を、丸底96ウェルプレート(ウェル中の1次抗体の50μlの適切な系列希釈物に添加した。室温にて15分間のインキュベーション後、細胞を、FACS緩衝液で3回洗浄した。最後の上清を除去した後、FACS緩衝液中で1対20希釈でフルオレセインイソチオシアネート(FITC)に結合させた50μlの2次抗体を細胞に添加した。細胞を、さらに15分間室温にてインキュベートし、そしてFACS緩衝液で3回洗浄した。フルオレセインと会合した細胞を、FACScan(Becton Dickinson, Fullerton, CA)で測定した。データを、Lysis IIプログラムを用いて分析した。FITC-抗-ラットイムノグロブリンを2次抗体として用いた場合、正常なマウス血清(10% v/v)を、マウス細胞との非特異的交差反応をブロックするために添加した。

【0561】(3. タンパク質の放射性標識) タンパク質を、MasonおよびWilliams(1980)、(プロトコル2)により記載されるクロラミンTプロトコルに従って¹²⁵ヨウ素を用いて標識した。ヨウ素化産物をG25で精製し、そしてモノクローナルフラグメントの場合は5% DMSOおよび5mg/ml ウシIgGの存在下で、そしてtTFの場合は5% DMSOおよび5mg/ml BSAの存在下で-70℃にて貯蔵した。比活性は、2.5μCi/μgと4.8μCi/μgとの間の範囲であった。

【0562】(4. 結合研究) ヒトtTFを、MasonおよびWilliams(1980)により記載されるクロラミンT手順(プロトコル2)を用いて2.5~4.8μCi/μgの比活性まで¹²⁵ヨウ素で標識した。2mg/ml BSAおよび0.02%アジ化ナトリウムを含有するPBS中のA20細胞の2×10⁶細胞/mlの懸濁液を、96ウェル丸底マイクロタイタープレートのウェルに50μlの容量で分配した。ウェルに、同じ緩衝液中に8~0.02μg/mlの濃度範囲にわたって調製した25μlの二重特異性抗体を添加した。

【0563】同じ緩衝液中の25μlの8μg/mlの¹²⁵I-tTFを各ウェルに添加し、モル過剰のtTFを得た。プレートを振盪し、そして4℃にて1時間インキュベートした。次いで、細胞を、2mg/ml BSAを含有する0.9%(w/v) NaClを用いてプレート中で3回洗浄した。ウェルの内容物を、微小遠心管中のジブチルフタレートおよびビス(2-エチルヘキ

シル) フタレート油の10:11 (v/v) 混合物上にピペットした。チューブを7500gにて1.5分間遠心分離し、そして液体窒素中で瞬間凍結させた。細胞を含有するチップを、切り離した。細胞ペレット中および上清中の放射活性を、 γ カウンター中で測定した。

【0564】(5. 凝固アッセイ) 上記結合アッセイに用いられたマイクロプレートと同一のマイクロプレートを、 ^{125}I -tTFの代わりに非標識tTFを添加したことを除いて同じ条件で設定した。4℃にて1時間インキュベーション後、細胞を前述のように3回洗浄し、そして2mg/ml BSAおよび12.5mM CaCl_2 を含有する75 μl の0.9% NaClに再懸濁した。ウェルの内容物を、5ml 透明プラスチックチューブに移し、そして37℃に暖めた。各チューブに、30 μl のクエン酸処理マウス血漿を37℃にて添加した。最初のフィブリンストランドを形成した時間を記録した。

【0565】(B. 結果)

(1. 抗体二重特異性) SFR8/10H10に関する二重特異性を、標的細胞としてのJ28細胞(TFポジティブ)および10H10の存在を示すためのFITC-抗マウス免疫グロブリンを用いてFACSにより示した。FITC-抗ラットイムノグロブリンを用いてSFR8の存在を示した。平均蛍光強度-対-濃度曲線は、両方の株の一致した。これは、マウスおよびラットの両方のアームが二重特異性調製物中に存在することを示す。

【0566】(2. 抗体結合) ^{125}I ヨウ素標識B21-2 Fab' およびSFR8 Fab' を用いる結合研究は、A20細胞に対するB21-2 Fab' の結合の飽和に達する濃度が21.5nMであることを示した。SFR8 Fab' は、21.5nMでは、B21-2 Fab' については細胞あたり530,000分子であるのに対して、細胞あたり50,000未満の分子数でA20細胞に非特異的に結合した。

【0567】(3. コアグュラント送達および拘束) コントロールの二重特異性抗体と比較した、tTFをB21-2/10H10二重特異性抗体を媒介してA20細胞に架橋させる能力を研究するために、A20細胞を、示すような濃度範囲の二重特異性抗体および ^{125}I -tTFとともにインキュベートした。飽和は、10nM (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 以上の二重特異性抗体の濃度で達成さ

れ、この時、平均310,000分子のtTFが各A20細胞に結合した。結合は特異的であった。なぜなら、tTF結合が、イソタイプにマッチするコントロールの二重特異性抗体(SFR8/10H10またはB21-2/OX7)のいずれにも媒介されなかったからである。これらの抗体は、tTFを拘束するために必要とされる2つの特性のうちの1つのみを有する(図1)。

【0568】(4. 凝固) 二重特異性抗体によりA20細胞に結合しているtTFが、凝固を誘導し得るか否かを調査するために、本発明者らは、まず第1に、A20細胞を21.5nM 二重特異性抗体および69nM tTFとともにインキュベートした。得られた凝固時間に対する影響を、表VIIに示す。これらの第1の研究は、B21-2/10H10およびtTFの複合体でコートされたA20細胞が、フィブリン形成を誘導し得ることを示した：これは、凝固時間を、140秒(用いられる特定の条件下で添加される抗体またはTFの非存在下で凝固する CaCl_2 中のマウス血漿についての時間)から60秒に短縮した。対照的に、コントロールの二重特異性抗体は、凝固の活性化を誘導しなかった：これらの場合では、凝固時間は、140秒であった。

【0569】後の研究は、最初の研究の結果を確認および拡張した。tTFがB21-2/10H10で拘束されているA20細胞にマウス血漿を添加すると、迅速に凝集した。フィブリンストランドは、非処理A20細胞へ添加される血漿中における164秒と比較して血漿添加の36秒後に見られた(表VII)。tTFが細胞に拘束されている場合にのみ凝固が誘導される：tTF単独、ホモダイマーF(ab')₂、Fab' フラグメント、またはtTFの拘束に必要な2つの特性のうち1つしか有さない二重特異性抗体とともにインキュベートした細胞については、凝固時間における影響は見られなかった。

【0570】各A20細胞に拘束されたtTF分子の平均数のlogとマウス血漿の凝固を誘導した細胞についての速度との間には、直線関係が存在した(図2)。細胞あたり300,000分子のtTFを有する細胞は40秒で凝固を誘導したが、細胞あたり20,000分子を有する細胞でさえも凝固は非処理細胞(190秒)についてよりも有意に速かった(140秒)。

【0571】

【表8】

表VII. 二重特異性抗体でA20細胞にtTFをにより拘束することにより誘導される
マウス血漿の凝固。

添加試薬 ¹	凝集時間 ² (秒)
なし	154 ± 4
B21-2/10H10 + tTF	36 ± 2
B21-2/10H10	163 ± 2
tTF	163 ± 3
B21-2/OX7 + tTF	165 ± 4
SFR8/10H10 + tTF	154 ± 5
10H10 F(ab') ₂ + tTF	160 ± 3
10H10 Fab' + tTF	162 ± 2
B21-2 F(ab') ₂ + tTF	168 ± 4
B21-2 Fab' + tTF	165 ± 4

¹ 二重特異性抗体であるF (a b ') ₂ およびF a b ' フラグメント (0 . 3 3 μ g / 1 0 ⁵ 細胞 / 1 0 0 μ l) ならびにもT F (0 . 1 7 μ g / 1 0 ⁵ 細胞 / 1 0 0 μ l) を、A 2 0 細胞とともに4℃にて1時間、0 . 2 % w / v アジ化ナトリウム中でインキュベートした。細胞を洗浄し、3 7℃に加温し、カルシウムおよび血漿を添加し、そして第1のフィブリンストランドが形成される時間を記録した。

² 3 連測定 of 相加平均 ± 標準偏差 (実施例 I I I)

(インビボでの特定腫瘍脈管系特異的凝固) 本実施例は、ヒト組織因子に対する送達ビヒクルとしての二重特異性抗体コアギュリガンドの投与後にもたらされる腫瘍脈管系のインビボでの特異的凝固を記載する。

【0572】(A. 材料および方法)

(1. 試薬) マウス血液を心臓穿刺により得、そして3 . 8 % 緩衝化クエン酸の1 / 1 0 容量に回収した。血液を3 0 0 0 g にて1 0 分間遠心分離し、そして血漿を少量で瞬間凍結し、そして- 7 0℃にて貯蔵した。

【0573】(2. 動物) BALB / c nu / nu マウスを、Simonsen (Gilroy, CA) から得て、そしてSPF条件下で維持した。

【0574】(3. C1300 (Mur) マウスモデルおよび処理) 腫瘍モデルは、3つの改良を加えた以外は、以前に記載された (Burrowsら、1992 ; Burrows & Thorpe, 1993) 通りであった。第1に、異なる抗体であるB21-2を用いた。この抗体は、両方の分子を認識する、以前に用いたM5 / 114抗体とは異なり、I - A^dを認識するが、I - E^dを認識しない。B21-2抗体は、M5 / 114よりも約10倍良好な親和性を有する。第2に、BALB / c nu / nu マウスにおいて連続的に増殖する、以前に用いたC1300 (Mur) 12株のサブ株を用いた。以前に用いたC1300 (Mur) 12細胞は、連続的に増殖する腫瘍を形成させるために非感染C1300細胞と混合しなければならなかった。C1300 (M

ur) t1P3と称する新しいサブ株を、以下ではC1300 (Mur) という。第3に、腸内細菌が胃腸内上皮においてI - A^dを誘導することを防止するために、マウスの飲料水中にテトラサイクリンを添加することは不必要であった。イムノトキシンとは異なり、コアギュリガンドは、I - A^d 発現胃腸上皮を損傷しない。

【0575】固形腫瘍の確立のために、1 . 5 × 1 0 ⁷ C1300 (Mur) 細胞を、BALB / c nu / nu マウスの右脇腹中に皮下的に注射した。腫瘍が直径0 . 8 cmまで増殖したら、マウスをランダムにそれぞれ7 ~ 8匹のマウスを含む異なる処置グループに割り当てた。

【0576】コアギュリガンドを、総容量2 . 5 ml の0 . 9 % NaCl中に二重特異性抗体 (140 μ g) およびtTF (110 μ g) を混合し、そしてこれらを4℃にて1時間放置することにより調製した。次いで、マウスにこの混合物 (すなわち、14 μ g の二重特異性抗体および11 μ g のtTF) 0 . 2 5 ml の静脈内注射を受けさせた。他のマウスは、14 μ g の二重特異性抗体単独、または11 μ g のtTF単独を受けた。この注射を、尾の静脈の1つに約45秒間にわたってゆっくりと行い、そして同じ静脈に200 μ l の第2の注射が続いた。この注射手順は、マウスに急速に注入される場合 (1 ~ 2秒間) に見られる尾の静脈の血栓を防ぐために適している。7日後、処置を繰り返した。

【0577】垂直腫瘍直径を、規則的な間隔において測定し、そして腫瘍容量を、以下の式に従って評価した : 容量 = 短径² × 長径 × π / 6。

【0578】腫瘍容量の差を、統計的有意さについて2つの独立サンプルについてMann-Whitney-Wilcoxon非パラメトリック試験を用いて試験した (Gibbons, 1976)。

【0579】組織病理学的分析については、動物を、処置後にメトフェンを種々の時間で用いて麻酔し、そしてヘパリン処理生理食塩水を用いる灌流により放血した。500 IUのヘパリンをi . v . 注射し、動物をメトフ

ァンで麻酔し、そして肝臓から血液が一掃されるまで 0.6 ml/分の流速でPBSを用いて全身の循環を灌流した。腫瘍および正常な組織を取り出し、そしてホルマリン固定した(4% v/v)。組織のパラフィン切片を切断し、そしてフィブリンの検出のために標準的なMartius Scarlet Blue (MSB) トリクロム技術を用いて、ならびに細胞形態学のためにヘマトキシリンおよびエオシンを用いて染色した。

【0580】(B. 結果)

(1. 改良腫瘍モデル) 前記のC1300 (Mur) 腫瘍モデル (Burrowsら、1992) を改良するために、本発明者らは、C1300 (Mur) 細胞株を、その親細胞であるC1300と混合することなく増殖し得るが、腫瘍の内皮細胞上でI-A^d MHC I Iクラス抗原をいまだ発現し得る細胞株にサブクローン化した。本発明者らは、FACSにより測定されるように、このモデルに使用される初期の抗I-A^d 抗体 (M5/114.15.2) よりも、その抗原に対して5倍~10倍高い親和性を有する抗I-A^d 抗体 (B21-2) を使用した。この新規抗I-A^d 抗体を用いるインビボ分布研究は、M5/114.15.2が示したのと同じ組織分布パターンを示した。B21-2を用いる濃い染色は、腫瘍血管内皮において見られ、薄い染色から中程度の染色は、肝臓中のクッパー細胞、脾臓中の周辺帯ならびに小腸および大腸のいくつかの領域に見られた。他の正常組織中の血管は、染色されなかった。

(2. 適切なインビボ用量の決定) マウスの尾静脈に静脈内注射された最大耐性用量は、16 μgのB21-2/10H10プラス11 μgのtTFであった。この用量で、マウスは体重が減少せず、正常な外観および活動レベルを有していた。20 μgのB21-2/10H10プラス16 μgのtTFのより高い用量では、10匹のマウスのうち2匹が、最終的には消散する局所的皮膚出血を発生した。より低い用量を、インビボ研究に採用した。静脈内で与えられた短縮型TF自体は、50 μgで無毒であった。

【0581】(3. 腫瘍血管系における特異的凝固および梗塞形成) B21-2/10H10 (20 μg) およびtTF (16 μg) からなる凝固リガンド (coagulant) の、固体C1300 (Mur) 腫瘍を有するマウスへの静脈内投与により、30分以内に腫瘍は黒化した挫傷外観を生じた。腫瘍内での現象の時間経過の組織学的研究は、凝固リガンドの注射30分後、腫瘍の全ての領域中の全ての血管が、血栓形成したことを示した (図3B)。血管は、血小板凝集、パックされた赤血球およびフィブリンを含んでいた。この時点で、腫瘍細胞は、健常であり、未処置マウスの腫瘍細胞と形態学的に区別できなかった (図3A)。

【0582】4時間までに、腫瘍細胞の窮迫の徴候が明らかになった。腫瘍細胞の大部分は、互いに分離し始

め、そしてピクノーゼ核を発生した (図3C)。赤血球は、通常、腫瘍間隙中に観察された。24時間までに、腫瘍壊死の進行が腫瘍中で見られた (図3D)。72時間までに、腫瘍の中央領域全体が形態学的に不明瞭な壊死組織片 (debris) に凝集した。

【0583】試験した3つの腫瘍のうち1つにおいて、5~10細胞層厚の腫瘍細胞の生存可能縁が、腫瘍の周辺で見られた。その周辺部で、腫瘍が周辺の正常組織に浸潤していた。同一の腫瘍の連続切片の免疫組織学的検査は、腫瘍浸潤領域中の血管がI Iクラス抗原を欠いていたことを示した。

【0584】30分または24時間前にB21-2/10H10二重特異性抗体 (20 μg) のみを受けたコントロールマウス由来の腫瘍は、梗塞形成の徴候を示さなかった。tTF (16 μg) のみ、あるいはB21-2/OX7またはSFR8/10H10との組み合わせを受けたマウス由来の腫瘍は、注射後30分では梗塞形成の徴候を示さなかったが、注射後24時間では腫瘍中の偶発的な血管 (全ての血管の約20%) が梗塞形成した。これらは、腫瘍の核において最も一般的であるようであった。

【0585】血栓または形態学的異常が、凝固リガンドまたはtTFの投与の30分後、4時間後および24時間後に腫瘍を有するマウスから取られた肝臓、腎臓、肺、腸、心臓、脳、副腎、膵臓および脾臓のパラフィン切片において見られなかった。

【0586】(4. 固形腫瘍の腫瘍退行) 図4は、B21-2/10H10およびtTFからなる凝固リガンドを、直径0.8 cmの腫瘍を有するマウスに投与した、代表的な抗腫瘍研究の結果を示す。腫瘍は、それらの処置前サイズの約半分に退行した。7日目で処置を繰り返すことにより、腫瘍はさらに、通常は完全に退行した。7匹の動物のうち5匹において、完全な退行が得られた。2匹のマウスは、4か月後および6か月後に続いて再発した。これらの抗腫瘍効果は、全ての他の群と比較した場合、統計学的に高度に有意 (P<0.001) である。

【0587】tTFのみ、またはイソ型が一致したコントロールの二重特異性抗体 (SFR8/10H10またはB21-2/OX7) と混合したtTFで処置したマウスの腫瘍は、抗体または希釈剤のみを受ける群の腫瘍よりも、よりゆっくり増殖した。これらの違いは、12日~14日で統計学的に有意 (P<0.05) であった。従って、B21-2/10H10凝固リガンドで見られた抗腫瘍効果の一部は、tTF自体のわずかな非特異的作用のためである。

【0588】研究の最後で、希釈剤のみで処置し、そして2.0 cm³ および2.7 cm³ の非常に大きな腫瘍 (すなわち、体重の10%~15%) を有した2匹のマウスに、凝固リガンド治療を行った。両方とも、完全な

緩解を有したが、それらの腫瘍はその後、腫瘍増殖の元の部位で再増殖した。

【0589】(C. 議論) 本研究は、凝固を誘導する能力を事実上有しない可溶性ヒト tTF が、腫瘍内皮細胞に対して二重特異性抗体により標的化される場合、腫瘍血管系に対して強力なトロンプゲンとなることを示す。インビトロ凝固の研究は、tTF の血栓活性の修復が、細胞表面上の抗原への架橋を介して仲介されることを示した。

【0590】tTF は、高親和性を有する第 VII 因子および第 VII a 因子を結合し、そして VII a の触媒活性を高めるが、血漿の凝固を誘導しない。なぜなら、tTF : VII a 複合体は、第 IX 因子および第 X 因子の効率的な活性化のために膜表面と会合しなければならないからである (Ruf ら、1991 ; Krishna swamy ら、1992)。二重特異性抗体による tTF : VII a の細胞表面への連結は、tTF : VII a を膜の極近くに近接させることにより凝固を誘導する能力を修復する。膜リン脂質は、第 IX 因子または第 X 因子との凝固開始複合体が、凝固プロセスにおいて中間体を組立て、そして効率的に生成し得る表面を提供する。

【0591】II クラスに対する凝固リガンドの、II クラスを発現する血管系を有する腫瘍を有するマウスへの投与は、腫瘍中の血管の急速な血栓症を引き起こした。これに引き続き、大部分の動物における腫瘍の梗塞および完全な腫瘍退行があった。完全な退行が得られなかった動物において、腫瘍は、腫瘍が周囲の正常組織に浸潤した腫瘍周辺部の腫瘍細胞の生存縁から再増殖した。腫瘍の増殖端での血管は、II クラス抗原を欠いていた。従って、凝固リガンドによるこれらの血管の血栓症がないことを説明する。これらの生存細胞は、既に見出されているように (Burrows および Thorpe、1993)、腫瘍細胞自体に作用する薬物を同時投与することにより死滅され得るようである。

【0592】凝固リガンドの抗腫瘍効果は、抗 II クラス抗体および脱グリコシル化リシン A 鎖からなるイムノトキシンを用いる同一の腫瘍モデルにおいて得られる効果 (Burrows および Thorpe、1993) と類似の大きさであった。2つの薬剤間の1つの違いは、作用の速度である。凝固リガンドは、30分未満で腫瘍血管の血栓症を誘導する。一方、イムノトキシンは同様の効果を達成するのに6時間要した。イムノトキシンはよりゆっくり作用する。なぜなら、血栓症は、タンパク質合成の閉鎖により生じる内皮細胞損傷に対して二次的であるからである。

【0593】イムノトキシンと凝固リガンドとの間の第2の重要な違いは、それらが異なる毒性の副作用を有することである。イムノトキシンは、抗生物質を与えて、腸内細菌による II クラス誘導を抑制しない限り、II クラス発現の胃腸上皮の致死破壊を生じた。凝固リガン

ドは、血液を除いて凝固因子が存在しないことから予想されるように胃腸損傷を生じなかったが、高用量で投与された場合に、いくつかのマウスにおいて凝固障害を生じた。

【0594】本報告に記載される知見は、ヒト凝固誘導タンパク質を腫瘍血管系に対して標的化する治療能力を示す。臨床適用のため、抗体または他のリガンドは、固形腫瘍の血管内皮細胞の表面に存在するが、正常組織の内皮細胞に存在しない分子に結合することが必要とされる。腫瘍内皮マーカーは、腫瘍由来血管形成因子 (Folkman、1985) またはサイトカイン (Burrows ら、1991 ; Rucio ら、1990) により直接誘導され得るか、あるいは新血管形成中の内皮細胞の急速な増殖 (Denekamp および Hobson、1982) および転移 (Folkman、1985) に関し得る。

【0595】いくつかの候補抗体が記載されている。エンドグリンに対する抗体である TEC-11 は、ヒト腫瘍内皮細胞に選択的に結合する特定の例である。

【0596】他の抗体として、エンドシアリンに対する FB5 (Retting ら、1992)、エンドグリン様分子に対する E-9 (Wang ら、1993)、フィブロネクチンのイソ型に対する BC-1 (Carnemolla ら、1989) ならびに骨肉腫関連抗原に対する TP-1 および TP-3 (Bruland ら、1988) が挙げられる。CD34 は、転移性内皮細胞および腫瘍および胎児組織における出芽性毛細管 (budding capillaries) のアルブミン (albumin) プロセスに対してアップレギュレートされることが報告されている (Schlingemann ら、1990)。血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) に対するレセプターは、おそらく低酸素症に応答して (Thieme ら、1995) 腫瘍血管においてアップレギュレートされ (Plate ら、1993 ; Brown ら、1993)、そして腫瘍血管において VEGF を選択的に濃縮する (Dvorak ら、1991)。

【0597】凝固誘導タンパク質をこれらのおよび他の腫瘍内皮細胞マーカーに標的化することによる腫瘍梗塞形成の誘導は、固形腫瘍の処置への価値のある新規アプローチとして提案される。専らヒト凝固リガンドを産生するために、ヒト (またはヒト化) 抗体のヒト凝固タンパク質への結合は、特に意図される。従って、与えられる処置過程を繰返すことにより、初期腫瘍およびその転移の両方と戦うことが可能となる。

【0598】(実施例 IV)

(短縮型組織因子 (tTF) 構築物の合成) tTF は、本明細書では成熟組織因子タンパク質の細胞外ドメイン (成熟タンパク質のアミノ酸 1~219 ; 配列番号 23) として示される。配列番号 23 は、例えば、配列番号 22 によりコードされる。

【0599】(A. H₆ [tTF]) H₆ Ala Met Ala [tTF]。tTF相補的DNA (cDNA) を、以下のように調製した：J-82細胞（ヒト膀胱ガン）由来のRNAを、tTFのクローニングのために使用した。全RNAを、GlassMaxTM RNAマイクロ単離試薬 (Gibco BRL) を用いて単離した。RNAを、GeneAmp RNA PCRキット (Perkin Elmer) を用いてcDNAに逆転写した。tTF cDNAを、同一キットを用いて以下の2つのプライマーで増幅した：

5' プライマー：5' GTC ATG CCA TGG CCT CAG GCA CTA CAA (配列番号1)

3' プライマー：5' TGA CAA GCT TAT TCT CTG AAT TCC CCC TTT CT (配列番号2)

下線を引いた配列は、tTFのN-末端をコードする。5' プライマー中の残りの配列は、発現ベクターへのtTFのクローニングを可能にするNco Iの制限部位である。3' プライマー中の配列は、発現ベクターへのtTFのクローニングのためのHind III部位である。PCR増幅を、製造者により提案されるように実施した。簡潔に述べると、75 μM dNTP；0.6 μM プライマー、1.5 mM MgCl₂ を使用し、そして95℃で30秒、55℃で30秒および72℃で30秒の30サイクルを実施した。

【0600】E. coli 発現ベクターH₆ pQE-60を、tTFを発現するために使用した (Leeら、1994)。PCR増幅tTF cDNAを、Nco IとHind 3部位との間に挿入した。H₆ pQE-60は、組込まれた(His)₆ コード配列を有し、その結果発現タンパク質は、N-末端で(His)₆ 配列を有し、これはNi-NTAカラムで精製し得る。

【0601】tTFを精製するため、tTF含有H₆ pQE-60 DNAを、E. coli TG-1細胞に形質転換した。細胞をOD₆₀₀ = 0.5まで増殖し、そしてIPTGを30 μMまで添加し、tTF産生を誘導した。30℃で18時間振盪後、細胞を採集した。細胞ペレットを6M Gu-HCl中で変性し、そして溶解液をNi-NTAカラム (Qiagen) に載せた。結合tTFを6M尿素で洗浄し、そしてtTFを、室温で16時間、6M～1M尿素の勾配で再び折り畳んだ (refold)。カラムを洗浄緩衝液 (0.05 NaH₂PO₄、0.3M NaCl、10%グリセロール) で洗浄し、そしてtTFを洗浄緩衝液中の0.2Mイミドゾール (Imidazole) で溶出した。溶出したtTFを濃縮し、そしてG-75カラムに載せた。tTF単量体を採取した。

【0602】(B. tTF) Gly [tTF]。Gly tTF相補的DNA (cDNA) を、PCRにおいて

5' プライマーを以下のプライマーで置き換えたこと以外は前記セクションに記載したのと同じ方法で調製した。

5' プライマー：5' GTC ATG CCA TGG CCC TGG TGC CTC GTG CTT CTG GCA CTA CAA ATA CT (配列番号3)

下線を引いた配列は、tTFのN-末端をコードする。残りの配列は、Nco Iの制限部位およびトロンビンの切断部位をコードする。

【0603】H₆ pQE-60発現ベクターおよびタンパク質精製の手法は、最終タンパク質生成物をトロンビンで処理してH₆ ペプチドを除去したこと以外は上記と同一である。これを、1部のトロンビン (Sigma) を500部のtTF (w/w) に添加することにより行い、そして切断を室温で18時間実施した。混合物をベンズアミジンセファロース6Bトロンビンアフィニティーカラム (Pharmacia) に通すことにより、トロンビンをtTFから除去した。

【0604】(C. システイン改変tTFs) tTF構築物を、N末端またはC末端システインで改変して、ジスルフィド結合を介する誘導体化抗体への結合を容易にした。

【0605】H₆ C [tTF]。(His)₆ Ala Met Ala Cys [tTF]。PCRにおいて5' プライマーを以下のプライマーで置き換えたこと以外は前記セクションに記載のように、DNAを作製した。

5' プライマー：5' GTC ATG CCA TGG CCT GCT CAG GCA CTA CAA ATA CTG TG (配列番号4)

すべての手法は、N-末端cysを交換可能な酸化剤/還元剤で保護したこと以外は、上記と同一であった。

【0606】C [tTF]。Gly Ser Cys [tTF 2-219]。PCRにおいて5' プライマーを以下のプライマーで置き換えたこと以外は前記セクションに記載のように、DNAを作製した。

5' プライマー：5' GTC ATG CCA TGG CCC TGG TGC CTC GTG GTT CTT GCG GCA CTA CAA ATA CT (配列番号5)

ベクター構築物およびタンパク質精製は、上記のようにトロンビン処理を使用して(His)₆ を除去したこと以外は、(His)₆ Ala Met Ala Cys [tTF] 構築物について記載したのと同じである。

【0607】H₆ [tTF] C。(His)₆ Ala Met Ala [tTF] Cys。3' プライマーを以下のプライマーで置き換えたこと以外は(His)₆ AMA [tTF] セクションに記載と同一の

方法で、DNAを作製した。

3' プライマー：5' TGA CAA GCT TA
G CAT TCT CTG AAT TCC CCC
TTT CT (配列番号6)

下線を引いた配列は、tTFのC末端をコードする。残りの配列は、tTFを発現ベクターにクローニングするためのHindIII制限部位を含有する。

【0608】全ての手法は、10mM β -MEを6M Gu-HCl変性溶液中で使用し、C末端システインを交換可能な酸化剤/還元剤で保護したこと以外はtTFセクションに記載と同一であった。

【0609】他の[tTF] Cys単量体(例えば、[tTF 1-220] Cys、[tTF 1-221] Cysおよび[tTF 1-222] Cys)もまた、同一の方法論を用いて作製(および結合)する。

【0610】(D. Cリンカー[tTF]) Cリンカー[tTF]であるGly-Ser-Cys-(Gly)₄-Ser-(Gly)₄-Ser-(Gly)₄-Ser-[tTF]もまた構築した。cDNAを、以下の2工程のPCR手法を用いて作製した：

PCR1：リンカーDNAの増幅

NcoI部位、トロンビン切断部位、システイン、リンカーおよびtTFのN末端をコードするcDNAを、以下のプライマーを用いて増幅した：

5' プライマー：5' GTC ATG CCA TG
G CCC TGG TGC CTC GTG GTT
GCG GA GGC GGT GGA TCA G
GC (配列番号7)

3' プライマー：5' AGT ATT TGT AG
T GCC TGA GGA TCC GCC ACC
TCC ACT (配列番号8)

下線を引いた配列は、リンカーペプチドをコードする。PCRにおいて使用したDNAテンプレートは、以下のリンカーをコードする二重鎖DNAであった。

配列：GGA GGC GGT GGA TCA GG
C GGT GGA GGT AGT GGA GGT
GGC GGA TCC (配列番号9)

tTFセクションに記載と同一のPCR条件を用いた。95b. p. 増幅生成物を、PCR2においてtTF DNAに結合した。

【0611】PCR2：CysリンカーDNAのtTF DNAへの結合。PCRに使用したDNAテンプレートは、2つの重複DNAであった：上記のPCR1由来の95b. p. DNAおよびtTF DNA。使用したプライマーは以下であった：

5' プライマー：5' GTC ATG CCA TG
G CCC TG (配列番号10)

3' プライマー：5' TGA CAA GCT TA
T TCT CTG AAT TCC CCC TTT

CT (配列番号11)

740b. p. の最終PCR生成物を、NcoIおよびHindIIIで消化し、そしてtTFセクションに記載のようにH₆ pQE 60に挿入した。

【0612】ベクター構築物およびタンパク質精製手法は、C[tTF]セクションに記載と全て同一である。

【0613】(実施例V)

(二量体組織因子の合成) 組織因子二量体が、凝固開始時に単量体よりも強力であり得ることを、本発明者らは推論した。J82膀胱ガン細胞の表面上の天然の組織因子が、二量体として存在し得ることが可能である(Fairら、1987)。1つの第VII因子または第VIIa因子分子の1つの組織因子分子への結合はまた、別の第VII因子または第VIIa因子の別の組織因子への結合を促進し得る(Fairら、1987; Bachら、1986)。さらに、組織因子は、サイトカインレセプターファミリーのメンバーに対して構造的相同性を示し(Edgingtonら、1991)、これらのいくつかは二量体化して活性レセプターを形成する(DaviesおよびWlodawer、1995)。従って、本発明者らは以下のようにTF二量体を合成した。

【0614】(A. [tTF]リンカー[tTF]) 構造Gly[tTF] (Gly)₄ Ser (Gly)₄ Ser (Gly)₄ Ser [tTF]を有するGly [tTF]リンカー[tTF]を作製した。2つのDNA断片を、以下のように、別々にPCR増幅し、結合し、そしてベクターに挿入した：

PCR1：tTFおよびリンカーDNAの5' 半分の調製。PCRにおけるプライマー配列は以下の通りである：

5' プライマー：5' GTC ATG CCA TG
G CCC TGG TGC CTC GTG GTT
CTT GCG GCA CTA CAA ATA
CT (配列番号12)

3' プライマー：5' CGC GGA TCC AC
C GCC ACC AGA TCC ACC GCC
TCC TTC TCT GAA TTC CCC
TTT CT (配列番号13)

Gly[tTF] DNAをDNAテンプレートとして使用した。さらにPCR条件はtTFセクションに記載の通りであった。

【0615】PCR2：リンカーDNAの3' 半分およびtTF DNAの調製。PCRにおけるプライマー配列は以下の通りであった：

5' プライマー：5' CGC GGA TCC GG
C GGT GGA GGC TCT TCA GGC
ACT ACA AAT ACT GT (配列番号14)

3' プライマー：5' TGA CAA GCT TA
T TCT CTG AAT TCC CCT TTC

T (配列番号15)。

【0616】tTF DNAをPCRにおいてテンプレートとして使用した。PCR1由来の生成物を、NcoIおよびBamHで消化した。PCR2由来の生成物を、HindIIIおよびBamH1で消化した。消化したPCR1 DNAおよびPCR2 DNAを、NcoIおよびHindIII消化のH₆ pQE 60 DNAと結合した。

【0617】ベクター構築物およびタンパク質精製のための手法は、Gly [tTF] セクションに記載と同一であった。

【0618】(B. Cys [tTF] リンカー [tTF])

構造Ser Gly Cys [tTF 2-219]

(Gly)₄ Ser (Gly)₄ Ser (Gly)₄ Ser [tTF] を有するCys [tTF] リンカー [tTF] もまた構築した。DNAを、以下のプライマーを用いてPCRにより作製した：

5' プライマー：5' GTC ATG CCA TGG CCC TGG TGC CTC GTG GTT CTT GCG GCA CTA CAA ATA CT (配列番号16)

3' プライマー：5' TGA CAA GCT TAT TCT CTG AAT TCC CCT TTC T (配列番号17)

[tTF] リンカー [tTF] DNAをテンプレートとして使用した。残りのPCR条件は、tTFセクションに記載と同一であった。ベクター構築物およびタンパク質精製は、全て、H₆ C [tTF] の精製に記載の通りであった。

【0619】(C. [tTF] リンカー [tTF] cys)

タンパク質構造 [tTF] (Gly)₄ Ser (Gly)₄ Ser (Gly)₄ Ser [tTF] Cys を有する [tTF] リンカー [tTF] cys 二量体もまた作製した。DNAを、以下のプライマーを用いてPCRにより作製した：

5' プライマー：5' GTC ATG CCA TGG CCC TGG TGC CTC GTG GTT GCA CTA CAA ATA CT (配列番号18)

3' プライマー：5' TGA CAA GCT TAG CAT TCT CTG AAT TCC CCT TTC T (配列番号19)

[tTF] リンカー [tTF] DNAをテンプレートとして使用した。残りのPCR条件は、tTFセクションに記載と同一であった。ベクター構築物およびタンパク質精製は、[tTF] cys セクションの精製に記載のように再度実施した。

【0620】(D. 化学的結合二量体)

[tTF] Cys 単量体を化学的に結合して、[tTF] Cys-Cys [tTF] 二量体を形成する。これを、室温で1時間、等モル量のDTTを保護した [tTF] Cys に添加して脱保護し、そして [tTF]

Cys のC末端でシステインを曝すことにより行う。等モル量の保護した [tTF] Cys を、DTT/[tTF] Cys 混合物に添加し、そして室温で18時間インキュベーションを続ける。二量体をG-75ゲル濾過カラムで精製する。

【0621】Cys [tTF] 単量体を、同一の方法を用いて化学的に結合して、二量体を形成する。

【0622】(実施例VI)

(組織因子変異体の合成) tTF結合第VII因子を第VIIa因子に変換する能力を欠く2つのtTF変異体を記載する。第VII因子と比較して、血漿中に第VIIa因子は300倍少なく存在する (Morrisseyら、1993)。従って、循環性の変異体tTFは、凝固をほとんど開始し得ず、それゆえ非常に低い毒性を示す。凝固リガンドにおいて、一旦変異体tTFが結合抗体を介して腫瘍部位に局所化すると、第VIIa因子が注入されてtTF結合第VII因子と交換する。変異体は、第VIIa因子の存在下で活性である。

【0623】(A. [tTF] G164A) 「[tTF] G164A」は、Alaにより置換されたtTFのアミノ酸164 (Gly) を有する変異体タンパク質構造を有する。Chameleon二重鎖部位特異的変異誘発キット (Stratagene) を、変異体の生成に使用する。DNAテンプレートはGly [tTF] DNAであり、そして変異誘発プライマーの配列は以下である：

5' CAA GTT CAG CCA AGA AAC (配列番号20)

上記のベクター構築物およびタンパク質精製手法を、Gly [tTF] の精製に使用する。

【0624】(B. [tTF] W158R S162A)

[tTF] W158R S162Aは、tTFのアミノ酸158 (Trp) がArgで置換され、そしてアミノ酸162 (Ser) がAlaで置換されている二重変異体である。[tTF] G164Aについての記載と同一の変異誘発方法を使用する。変異誘発プライマーは以下である：

5' ACA CTT TAT TAT CGG AAC TCT TCAGCT TCA GGA AAG (配列番号21)

前記ベクター構築物およびタンパク質精製手法を、Gly [tTF] の精製に使用する。

【0625】(実施例VII)

(組織因子接合体の合成)

(A. 化学的誘導体化および抗体結合) 抗体tTF接合

体を、ジスルフィド結合を介して、化学的に誘導体化した抗体を化学的に誘導体化したもTTFに結合することにより合成した(図5に例示するように)。

【0626】抗体を5倍モル過剰のスクシンイミジルオキシカルボニル- α -メチル α -(2-ピリジルジチオ)トルエン(SMPT)と室温で1時間反応させて、抗体1分子あたり平均2個のピリジルジスルフィド基を有する誘導体化抗体を得た。誘導体化抗体を、ゲルパーミエーションクロマトグラフィーにより精製した。

【0627】抗体に対して2.5倍モル過剰のもTTFを、45倍モル過剰の2-イミノチオラン(2IT)と室温で1時間反応させて、もTTF1分子あたり平均1.5個のスルフヒドリル基を有するもTTFを得た。誘導体化もTTFもまた、ゲルパーミエーションクロマトグラフィーにより精製し、そして直ちに誘導体化抗体と混合した。

【0628】混合物を放置して室温で72時間反応させ、次いでSephacryl S-300カラムに添加して抗体-もTTF接合体を遊離もTTFおよび遊離したピリジン-2-チオンから分離した。接合体を、抗もTTFカラムのアフィニティークロマトグラフィーにより遊離抗体から分離した。最終接合体生成物の優勢な分子種は、SDS-PAGEにより評価されるように、より少量の多置換接合体(Mr約202,000以下)を有する単置換抗体-もTTF接合体(Mr 約176,000)であった。

【0629】(B. システイン改変もTTFの誘導体化抗体への結合) 抗体-C[TTF]および[もTTF]C接合体を、ジスルフィド結合を介して、システイン改変もTTFを化学的に誘導体化した抗体に直接結合することにより合成した(図5に例示するように)。

【0630】抗体を、12倍モル過剰の2ITと室温で1時間反応させて、抗体1分子あたり平均1.5個のスルフヒドリル基を有する誘導体化抗体を得た。誘導体化抗体をゲルパーミエーションクロマトグラフィーにより精製し、そして直ちに2倍モル過剰のシステイン改変もTTFと混合した。混合物を放置して室温で24時間反応させ、次いで接合体を、上記のようにゲルパーミエーションクロマトグラフィーおよびアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

【0631】最終接合体の優勢な分子種は、SDS-PAGEにより評価されるように、より少量の多置換接合体(Mr 約202,000以下)を有する単置換接合体(Mr 約176,000)であった。

【0632】(C. システイン改変もTTFのFab'フラグメントへの結合) 抗体-Fab'-C[もTTF]および[もTTF]C接合体を調製する。このような接合体は、インビトロにおいてより強力であり得る。なぜなら、このような接合体は、制限された内在化(internalization)能により、2価接合体よりも長く

細胞表面上に残存するからである。Fab'フラグメントを、2倍モル過剰のシステイン改変もTTFと24時間混合し、次いで接合体を、上記のようにゲルパーミエーションクロマトグラフィーおよびアフィニティークロマトグラフィーにより精製する。

【0633】(D. もTTF接合体の凝固活性) もTTF接合体を、A20細胞に対する表面上で発現されるIIクラス抗原に結合するB21-2モノクローナル抗体を用いて調製した。接合体を、化学的に誘導体化したもTTFおよびシステイン改変もTTFを用いて調製し、そしてCaCl₂中のマウス血漿を凝固する接合体の能力を、A20細胞の表面への結合後測定した。

【0634】両方のB21-2接合体は、用量依存様式で、CaCl₂中のマウス血漿(コントロール)の凝固時間を短縮した。もTTF接合体は、二重特異性抗体B21-2/10H10を用いて、A20細胞の表面にもTTFを連結した場合に生じるのと同様の凝固促進を示した(図6)。

【0635】(E. 抗腫瘍細胞もTTF接合体) もTTFが腫瘍血管内皮細胞に標的化される場合、もTTFが腫瘍血管内で凝固を誘導することが既に確立されている(実施例I~III)。本発明者らは、もTTFが腫瘍細胞の表面に標的化される場合、凝固が腫瘍血管内で誘導されることを意図した。

【0636】3つの抗腫瘍細胞抗体(KS1/4、D612、およびXMMC0-791)を、上記の「もTTF接合体の調製」セクションに記載のようにもTTFに結合した。KS1/4を、Scripps Research Institute、Department of Immunology、La Jolla、CaliforniaのDr. R. Reisfeldから得た。そしてこれは米国特許第4,975,369号にも記載されている；D612は、NCI、Laboratory of Tumor Immunology and Biology、Bethesda、MarylandのDr. J. Schlomから得、米国特許第5,183,756号に記載されており、そしてATCCハイブリドーマ細胞株アクセション番号HB 9796由来の培養上澄みから得られ得る；XMMC0-791は、ATCCから購入したハイブリドーマ細胞株由来の組織培養上澄みから精製した。

【0637】ヒト結腸ガン細胞株Widrを、KS1/4に対する標的細胞として使用した。Widr細胞をATCCから購入し、そして10%(v/v)ウシ胎児血清、L-グルタミンおよび抗生物質を補充したDMEM中、空気において10%(v/v)CO₂雰囲気中で維持した。ヒト結腸ガン細胞株LS147Tを、D612に対する標的細胞として使用した。LS147T細胞をATCCから購入し、そして10%(v/v)ウシ胎児血清、L-グルタミンおよび抗生物質を補充したRPM

I 中、空気において5% (v/v) CO₂ 雰囲気中で維持した。ヒトの非小細胞肺癌細胞株H460を、XMMC0-791に対する標的細胞として使用した。H460細胞を、Dr. Adi Gazdar、Simmons Cancer Center、University of Texas Southwestern Medical Center、Dallas、Texasから得、そして10% (v/v) ウシ胎児血清、L-グルタミンおよび抗生物質を補充したDMEM中、空気において10% (v/v) CO₂ 雰囲気中で維持した。3つの細胞株は全て、付着性単層として増殖した。

【0638】接合体を、関連の標的抗原を発現する腫瘍細胞に結合した場合、CaCl₂ 中のマウス血漿の凝固時間を増大する能力について試験した。腫瘍細胞を、PBS中の0.05% (w/v) EDTAを用いて組織培養フラスコから取り出した。細胞を、TF9-6B4およびTF8-5G9抗体でプレインキュベートして任意の天然の組織因子活性を中和し (Morrisseyら、1988)、次いで凝固アッセイをA20細胞について記載の通りに実施した。

【0639】全ての3つの接合体は、標的細胞株に結合した場合、用量依存様式で、CaCl₂ 中のマウス血漿 (コントロール) の凝固時間を短縮した (図7)。これは、tTFが細胞表面に標的化された場合、凝固が腫瘍細胞の表面で加速されたことを示す。

【0640】(実施例VII I)

(組織因子プロドラッグの合成) 例示的なtTFプロドラッグは以下の構造を有する：tTF₁₋₂₁₉ (X)_{n1} (Y)_{n2} Zリガンド、ここでtTF₁₋₂₁₉ は、サイトゾルドメインおよび膜貫通ドメインを除いたTFを表し；Xは、長さn1のアミノ酸 (AA) の疎水性膜貫通ドメイン (1-20 AA) を表し；Yは、長さn2のAAの親水性プロテアーゼ認識配列 (適切なプロテアーゼ認識を確実にするに十分なAA) を表し；Zは、ジスルフィドチオエステルまたは他の結合基 (例えば、(Cys)₁₋₂) を表し；リガンドは、腫瘍細胞、腫瘍EC、結合組織 (支質) または基底膜マーカーを認識する抗体または他の標的化部分を表す。

【0641】tTFプロドラッグは、疾患組織 (すなわち、腫瘍) への局所化を可能にする静脈内注射を意図する。一旦疾患組織に局所化されると、内因性プロテアーゼ (すなわち、メタロプロテイナーゼ、トロンビン、第Xa因子、第VIIa因子、第IXa因子、プラスミン) は、プロドラッグ由来の親水性プロテアーゼ認識配列を切断する。これは、疎水性膜貫通配列を局所細胞膜に挿入することを可能にする。一旦その尾部 (tail) が膜内に挿入すると、tTFは凝固誘導特性を回復

し、その結果疾患組織の血管において凝固を形成する。

【0642】(実施例IX)

(G1a修飾を欠く凝固因子の合成) G1a (γ-カルボキシグルタミン酸) 修飾を欠くビタミンK依存性凝固因子 (第II/IIa因子、第VII/VIIa因子、第IX/IXa因子および第X/Xa因子) は、凝固リガンドの形成に有用であることを意図する。G1a修飾を欠く凝固因子は、貧弱な凝固剤である。なぜなら、非修飾因子は脂質膜と効率的に会合しないからである：リガンドを介した因子の腫瘍の血管または他の部位への標的化により、因子は細胞表面近傍に戻されるはずであり、そしてその部位での凝固の進行を可能にするはずである。

【0643】「G1a」は、存在するGlu (グルタミン酸) 残基の翻訳後修飾により作製される。G1a修飾を欠くビタミンK依存性凝固因子 (第II/IIa因子、第VII/VIIa因子、第IX/IXa因子および第X/Xa因子) は、GluをG1aに改変しない宿主 (例えば、細菌) 中でビタミンK依存性凝固因子をコードする遺伝子を発現することにより作製され得る。第II/IIa因子、第VII/VIIa因子、第IX/IXa因子および第X/Xa因子のそれぞれをコードするDNA配列は、それぞれ配列番号24、配列番号25、配列番号26および配列番号27として本明細書に包含される。従って、原核生物の発現は簡単である。

【0644】このようなG1a欠失因子はまた、この遺伝子を発現する前に、この場合は実質的に任意の宿主細胞において、相当するGlu残基を他のアミノ酸に変化させるように上記の配列のいずれか (配列番号24、配列番号25、配列番号26、および配列番号27) を変異させることにより作製され得る。変化されるべきコドンは、GAGコドンである (GAAもまたGluをコードし、これは避けられるべきである)。例示として第VII因子を用いて、G1a「ドメイン」は、一般に216~325領域に位置する。第一のG1aコードトリプレットは、配列番号25の231に存在し、そして最後は、配列番号25の318から伸長する。GAGコドンは、分子生物学的技術を用いて容易に変化され得る。

【0645】図8は、上記のビタミンK依存性凝固因子の各々のG1aドメインが、類似した領域に位置することを示す。それ故、配列番号24、配列番号26、および配列番号27のいずれか1つにおける、いわゆる「相当する」Glu残基の変異はまた、容易に理解される。

【0646】以下のコドンの表は、所定のG1aコードコドンまたは配列を改変することにおいて作製される変異の容易な選択を可能にするために提供される。

【0647】

【表9】

アミノ酸			コドン			
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU
システイン	Cys	C	UGC	UGU		
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU		
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG		
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU		
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU		
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU	
リジン	Lys	K	AAA	AAG		
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC
メチオニン	Met	M	AUG			
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU		
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG		
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC
スレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU
トリプトファン	Trp	W	UGG			
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU		

部位特異的変異誘発は、基礎を成すDNAの特定の変異誘発およびこのDNAへの1つ以上のヌクレオチド配列の変化の導入による、G1a改変されていない個々のビタミンK依存性凝固因子の調製における使用が意図される技術である。

【0648】部位特異的変異誘発は、横断される欠失連結部の両側に安定な2重鎖を形成するための十分なサイズおよび配列の複雑さのプライマー配列を提供するために、所望の変異のDNA配列をコードする特定のオリゴヌクレオチド配列、ならびに十分な数の隣接したヌクレオチドの使用により変異体を生成させる。代表的には、改変される配列の結合部の両側に約5～10残基を有する、約17～25ヌクレオチドの長さのプライマーが好ましい。

【0649】一般には、部位特異的変異誘発の技術は、Adelmanら、(1983)のような刊行物および上記のTF変異体研究により例示されるように、当該分野において周知である。この技術は、代表的には1本鎖および2本鎖形態の両方で存在するファージベクターを使用する。部位特異的変異誘発において有用な代表的なベクターは、M13ファージ(Messingら、1981)のようなベクターを包含する。これらのファージは、容易に商業的に入手可能であり、そしてこれらの使用は、一般に当業者に周知である。2本鎖プラスミドはまた、目的の遺伝子をプラスミドからファージに移す工程を削除する部位特異的変異誘発において日常的に用いられる。

【0650】一般に、本明細書による部位特異的変異誘

発は、最初に1本鎖ベクターを得ること、または2本鎖ベクターの2本鎖を融解して分離することにより実施される。このベクターは、ビタミンK依存性凝固因子をコードするDNA配列をその配列内に含む。所望の変異配列を保有するオリゴヌクレオチドプライマーが(一般的には、例えばCreaら、(1978)の方法により合成的に)調製される。次いで、このプライマーは、1本鎖ベクターとアニールされ、そして変異保有鎖(mutation-bearing strand)の合成を完了するために、E. coliポリメラーゼI(KlenowフラグメントのようなDNA重合酵素)に供される。従って、ヘテロ2重鎖が形成され、ここで1つの鎖は、本来の非変異配列をコードし、そして第2の鎖は所望の変異を保有する。次いで、このヘテロ2重鎖ベクターは、適切な細胞(例えば、E. coli細胞)を形質転換するために使用され、そして変異配列アレンジメントを保有する組換えベクターを含有するクローンが選択される。

【0651】(実施例X)

(さらなる抗腫瘍血管系抗体)本実施例は、腫瘍血管系と正常な組織の血管系とを区別することにおける使用のための腫瘍由来内皮細胞「結合因子」に対する抗体の生成を記載する。特に、血管透過因子(VPF)(血管内皮細胞増殖因子(VEGF)とも呼ばれる)に対する抗体およびbFGF(塩基性線維芽細胞増殖因子)に対する抗体の生成を記載する。

【0652】FGFに関してさらに詳細には、Gomez-PinillaおよびCotman(1992)；

Nishikawaら、(1992) (塩基性線維芽細胞増殖因子の局在化を記載している) ; Xuら、(1992) (FGFの発現および免疫化学的分析に関する) ; Reillyら、(1989) (モノクローナル抗体に関する) ; Dixonら、(1989) (FGF検出および特徴付けに関する) ; Matsuzakiら、(1989) (ヘパリン結合成長因子に対するモノクローナル抗体に関する) ; ならびにHerblinおよびGross (1992) (血管系に関連した固形腫瘍におけるbFGFについての結合部位を議論している) を引用し得る。

【0653】本研究において、ウサギを、ツベルクリン (精製されたタンパク質誘導体、PPD) またはチログロブリンキャリアーとカップリングした、ヒトVEGF、マウスVEGF、モルモットVEGF、ヒトbFGF、マウスbFGF、またはモルモットbFGFのN末端ペプチドで過免疫した。これらのペプチドは、25〜26アミノ酸の長さであり、そしてC末端残基としてシステインを用いてペプチド合成機で合成した。抗血清を、Sephacroseマトリックスにカップリングしたペプチドのカラムにおいてアフィニティー精製した。

【0654】VEGFに対する抗体を、ELISAならびにモルモットの腫瘍および正常組織の凍結切片におけるそれらの染色パターンにより同定した。モルモットVEGFおよびヒトVEGFに対するポリクローナル抗体は、それぞれ、モルモットL10腫瘍および種々のヒト

モルモット VEGF	APMAEGEQKPREVVVFMDVYKRSYC
ヒト VEGF	APMAEGGGQNHHEVVVFMDVYQRSYC
モルモット bFGF	MAAGSITTLPALPEGGDGGAFAPGC

ペプチドを、スクシミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート (SMCC) でチログロブリンを誘導体化し、そして誘導体とペプチドを反応させることにより、チログロブリンまたはPPDに接合させた。これは、チログロブリンへのチオエーテル結合により連結される1つ以上のペプチド配列を有する接合体を与える。

【0658】特に、上記配列に対するモノクローナル抗体の生成を、以下の手順を用いて達成した：BALB/cマウスを、いくつかの部位へのペプチド-PPDまたはペプチド-チログロブリンでの連続した注射により免疫した。最後の注射の4または5日後に、脾臓を取り出し、そして脾細胞を、Morrowら、(1991)に刊行された手順に従ってポリエチレングリコールを用いて、P3xG3Ag8.653骨髓腫細胞と融合した。

【0659】個々のハイブリドーマ上清を以下のようにスクリーニングした：

腫瘍 (耳下腺ガン、卵巣ガン、乳ガン) の凍結切片上の大多数の血管内皮細胞と反応した。抗ヒトVEGF抗体は、正常なヒト腎臓糸球体における内皮細胞を取り囲む糸球体間質細胞および肝臓における内皮細胞を染色したが、しかし正常なヒトの胃、脚の筋肉、および脾臓における血管を染色しなかった。抗モルモットVEGF抗体は、腎臓、脳、脾臓、心臓、精嚢、肺、大腸、胸腺、前立腺 (prostate)、肝臓、精巣、および骨格筋を含む正常な組織のいずれにおいても内皮細胞を染色しなかった。

【0655】ヒトFGFに対するポリクローナル抗体は、耳下腺ガンおよび卵巣ガンにおける内皮細胞を染色したが、しかし乳ガンにおける内皮細胞を染色しなかった。抗ヒトFGF抗体は、ヒト腎臓における糸球体内皮細胞を染色したが、しかし正常な胃、脚の筋肉、および脾臓における内皮細胞を染色しなかった。

【0656】モルモットVEGF、ヒトVEGFおよびモルモットbFGFに対するモノクローナル抗体を、PPDまたはチログロブリンにカップリングしたN末端配列ペプチド (ペプチドのC末端にシステインを有する) でBALB/cマウスを免疫することにより調製した。規定された配列の合成ペプチド免疫原は、以下に示され、そしてそれぞれ配列番号30、配列番号31、および配列番号32で表される：

【0657】

【表10】

第1のスクリーニング：ペプチド-チログロブリン被覆したプレートにおけるELISA。

第2のスクリーニング：チログロブリンへのSMCCにより連結されたシステインにおけるELISA。

第3のスクリーニング：モルモット株10腫瘍またはヒト耳下腺ガンの凍結切片の間接的免疫ペルオキシダーゼ染色。

第4のスクリーニング：種々の悪性および正常なモルモットおよびヒトの組織の凍結切片の間接的免疫ペルオキシダーゼ染色。

【0660】ペプチド-チログロブリンに結合するが、しかしシステイン-チログロブリンに結合しない抗体を選択した。これらの抗体は、正常な組織における内皮細胞に結合するよりも強力に悪性腫瘍における内皮細胞に結合した (表VII)。

【0661】

【表11】

表 VIII
モノクローナル抗体の反応性

MoAB	抗原	種	腫瘍内皮との反応性		腫瘍反応性のパターン*
			モルモット	ヒト	
GV14	gp VEGF	IgM	+	+	BV + いくつかの腫瘍細胞
GV35	gp VEGF	IgM	±	±	腫瘍細胞、BVにおいて弱い
GV39	gp VEGF	IgM	+	+	BV およびいくつかの腫瘍細胞
GV59	gp VEGF	IgM	+	+	BV およびいくつかの腫瘍細胞
GV97	gp VEGF	IgM	+	+	BV、腫瘍細胞において弱い
HV55	hu VEGF	IgG	?	+	基底膜、いくつかのBV
GF67	gp FGF	IgM	±	+	BV および腫瘍細胞
GF82	gp FGF	IgM	±	+	BV および腫瘍細胞

* BV : 血管 + gp = モルモット pig hu = ヒト

(A. ヒトおよびモルモット組織切片のGV97染色)
モルモットVEGF N末端に対するGV97抗体は、種々のヒト悪性組織(表IX)および正常組織(表X)における内皮細胞に結合した。
【0662】悪性腫瘍における内皮細胞への結合は、正常組織における内皮細胞への結合を超過する傾向があった。
【0663】モルモット腫瘍(株10肝細胞性ガン)および正常組織における内皮細胞の染色は、分布および強

度においてヒト組織に観察された染色と類似した(表XI)。
【0664】表において、+は、ネガティブな結果に対立するものとしてのポジティブな結果を示す。数値2+、3+、および4+は、当該研究分野で日常的に理解されるように、増大する強度のポジティブシグナルをいう。
【0665】
【表12】

表 IX. ヒト腫瘍における抗 GPVEGF

		精製 GV97							
腫瘍 組織	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml または 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV3 9	GV59 supt.
消化管									
92-01-A073 食道ガン		2+	1+	+/-	-ve			4+	4+
M4 耳下腺						4+			
87-07-A134 耳下腺ガン		3+	2+	+/-	-ve			3+	4+
M5 耳下腺						4+			
88-04-A010 耳下腺腺ガン		1-2+	1+	-ve	-ve				1-3+
90-11-B319 膵臓から肝臓への腺ガン						3-4+		3- 4+	
94-02-B021C 膵臓の腺ガン						3-4+		3- 4+	
93-10-A333 正常に存在する膵臓の腺ガン	4+	2-4+	1-4+	-ve-1+		4+			3+

表 IX 続き

腫瘍 組織	20 ug/ml	精製 GV97		1ug/ml または 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV3 9	GV59 supt.
		10ug/ml	5ug/ml						
93-02-B004 膵臓の線毛状および 腺腔様細胞	4+	3-4+	2-4+	1-2+		3-4+		2- 3+	
93-02-A130 膵臓の平滑筋肉腫		3+	2+	+/--1+	-ve	4+		4+	3-4+
93-02-B020 胃ガン		4+	2+	2-3+	-ve- 1+			1- 2+	4+
93-04-A221 肝臓ガン		3-4+	2-3+	1-2+	-ve- 0.5+			4+	4+
94-04-A390 直腸腺ガン		4+	3+	1-2+	1+				3+
93-12-A160 舌ガン 腺ガン		1-2+	+/-	-ve	-ve			3+	3+
101-84a 腎 印環ガン (101-84b と同一)		3+	2+	-ve-1+	-ve	大部分は 1-2+ であるが 少数は 3-4+			3+
90-05-A172 腎腺ガン		4+	3+	1-2+	-ve- 1+			-ve	3+

表 IX 続き

		GV97							
腫瘍 組織	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV3 9	GV59 supt.
生殖系									
91-10-A115 外陰部の 扁平上皮細胞がん	1-4+	1-3+	1-2+	1-2+		1-4+			1-3+
93-03-A343 前立腺 腺腫		+/- - 3-4+	+/- ~ 2-3+	+/- ~ 1-2+	+/-			3- 4+	3-4+
筋 肉									
免疫系									
泌尿器系									
93-10-B002 腎細胞がん						2+			3+
90-01-A225 腎細胞がん		4+	4+	大部分の 3-4+	いくつかの 1-3+	3-4+		3+	3-4+
93-01 A257 膀胱の移行細胞がん	3-4+	2-3+	1-2+	+/-		2-3+			2-3+

表 IX 続き

		精製		GV97						
腫瘍 組織	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV3 9	GV59 supt.	
内分泌系										
94-01-A246 副腎の褐色細胞腫	4+	4+	3-4+	3+		4+			3-4+	
93-11-A074 副腎皮質がん	3-4+	3-4+	2-3+	1+		3-4+			4+	
呼吸器系										
93-08-N009 肺腺がん						1-4+		3- 4+	3-4+	
92-10-A316 扁平上皮細胞肺がん		4+	3-4+	1-2+	-ve- 0.5+			4+	4+	
03-05-A065 肺腺がん		4+	3-4+	-ve-1+	1+			3+	3+	
中枢神経系										
94-01-A299 リンパ節への悪性転移 神経鞘腫	4+	4+	4+	3-4+		4+			3-4+	
92-10-A139 髄膜腫	4+	3-4+	2-3+	1-2+		4+			3-4+	

表 ix 続き

腫瘍組織	20 ug/ml	精製 GV97		1ug/ml 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV3 9	GV59 supt.
		10ug/ml	5ug/ml						
91-12-A013 髄膜腫	4+	2-3+	-ve-3+	+/-		4+			3+
93-03-A361 不定型 髄膜腫		4+	4+	3+	2+	4+			3+
外皮系									
94-04-V037 皮膚 扁平上皮細胞がん w/正常		-ve ~ 4+	-ve ~ 3+	-ve ~ 1+	-ve			2- 3+	2-3+
89-02-225 骨肉腫		4+	3-4+	1+	1+			4+	2+
種々の腫瘍									

【0666】

【表13】

表 x. 以上正常組織に対する抗-GPVEGF

		精製 GV97							
腫瘍組織	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml 及び 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV39	GV59 supt.
消化器系									
91-01-A128 膀胱w/ 膀胱癌		3+	2+	1+	-ve			2-3+	2-3+
94-02-B070 単純結腸						2-3+		2-3+	
92-01-A292 N. 結腸	4+	4+	4+	3-4+		4+			3-4+
93-10-A116 N. 結腸	2-4+	1-4+	1-3+	-ve-2+	-ve	3-4+		2-3+	3-4+
90-06-A116 N. 結腸						弱くは 3+		2+	
93-02-A350 N. 食道		3-4+	3+	1+	+			4+	4+
93-05-A503 N. 回腸						4+			4+

表 x 続き

		精製 GV97							
腫瘍組織	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml または 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV39	GV59 supt.
94-03-A244 N. 肝臓		4+	1-3+	-ve-1+	-ve			4+	4+
90-02-B132 N. 肝臓	少数の 1+	+	-ve	-ve	-ve	1-3+	2- 3+	2-3+	2-3+
94-01-A181 N. 肝臓		1-4+	1-3+	少数の 1~3+	-ve				3-4+
90-05-D008 N. 脾臓		2-4+	1-3+	+	-ve			2-3+	2-3+
93-05-A174 N. 耳下腺		少数の 2+	少数の 1~2+	少数の 1+	-ve	-ve		少数の 3+	2-3+
94-04-A391 N. 小腸		1-3+	-ve-2+	-ve	-ve				3+
88-06-107 N. 胃	3+	2+	+	-ve		3-4+			3+
101-84b N. 胃 (101-84a と一致)		主要部および 周辺部において 3~4+	主要部において 2~3+ そして 周辺部において 3~4+	主要部において 1/2 ~ 3/2 周辺部において 2+	主要部において -ve であり 周辺部において 1+	3+			3-4+

表 x 続き

		精製 GV97							
腫瘍組織	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml または 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV39	GV59 supt.
90-11-B337 N.		2-3+	+-1+	-ve	-ve			3+	3+
生殖路									
93-04-A041 N. 胸部						4+		3+	
94-02-A197 N. 胸部 w/線維嚢胞 の変化						4+		3+	
93-02-A051 胸部 w/線維嚢胞 の変化		-ve-1+	-ve	-ve	-ve			+	1-2+
93-02-A103 胸部 w/線維嚢胞 の変化	4+	3+	2+	1+					
92-11-A006 N. 子宮頸部	大部分の 2+	大部分の 1~2+	0.5+	-ve	-ve	いくつかの 1~2+			大部分の 3+

表 x 続き

		精製 GV97							
腫瘍組織	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml 又は 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV39	GV59 supt.
91-03-A207 N. 子宮頸部		2.5+	1.5+	1+	.5+				2-3+
92-02-A139 N. 卵巣 w/黄体	大部分において 1+と3+ 1つの領域 では2+	大部分において -veであるが 1つの領域 では1+	-ve	-ve		大部分に おいて-ve であるが 1つの領域 では3-4+			大部分に おいて -veであるが 1つの領域 では3-4
93-06-A118 N. 前立腺		少数の1+	-ve	-ve	-ve				3+
93-11-A317d 前立腺片		3-4+	2-3+	-ve-3+	-ve-1+			3-4+	3-4+
93-02-A315 精囊		0.5-1+	0.5+	-ve	-ve			1+	1-2+
92-04-A089 N. 精囊		1+	+	+	+			1-2+	
91-04-A117 尿管 w/炎症		1+	+	-ve	-ve			+/1+	3-4+

表 x 続き

		精製 GV97							
腫瘍組織	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml 又は 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV39	GV59 supt.
筋肉									
94-01-A065 N. 心臓		3-4+	2+	+/	-ve			3-4+	4+
91-07-0007 N. 骨格筋	1-4+	1-3+	1-2+	-ve	-ve	1-3+			1-3+
95-03-A395 N. 骨格筋		4+	3-4+	1-2+	0.5-1+			4+	4+
免疫系									
90-01-A077 N. リンパ節	2-3+	2+	いくつか 1+	-ve	-ve	2-3+			3-4+
90-08-A022 N. リンパ節		大部分は1+であるが 少数は4+	大部分は0.5+ であるが少数は 2+	大部分は-veであるが 少数は2+	大部分は-veであるが 少数は0.5-1+			3+	3+
91-03-A057 N. リンパ節		2+	1+	+/	-ve			3-4+	3-4+
91-09-B017E 単純 リンパ節		3+	2+	+/1+	-ve			2-3+	2-3+

表 X 続き

		精製 GV97							
腫瘍組織	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml 又は 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97/ supt.	GV1 4	GV39	GV59 supt.
93-07-A236 N. Spicen		3-4+	3-4+	-ve-3+	-ve				2-4+
93-07-252 N. spicen		3+	1+	+/-	-ve			2-3+	
内分泌系									
94-04-A252 N. 副腎 w/ 髄質および皮質	4+	4+	3-4+	1-2+		4+			3+
93-05-A086 N. 副腎髄質		大部分は -ve 少数は 1-2+	大部分は -ve 少数は 1-2+	-ve	-ve			2-3+	3-4+
92-03-A157 過形成の 甲状腺		1+	+/-	+/-	-ve			4+	4+
91-03-B019 N. 甲状腺		-ve-3+	-ve-2+	-ve-1+	-ve			2-3+	2-3+
泌尿器系									

表 X 続き

		精製 GV97							
腫瘍組織	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml 又は 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97/ supt.	GV1 4	GV39	GV59 supt.
93-09-A048 N. 腎臓						4+			2-3+
91-11-A075 N. 腎臓		4+	3+	2+	1+	糸球体 では 4+		糸球体 では 4+	糸球体 では 4+
93-10-B001 N. 腎臓		4+	3+	+/-	-ve	糸球体では 4+		糸球体 では 4+	糸球体 では 4+
外皮系									
92-08-A029 N. 胸部皮膚		+/- to 4+	+/- to 3+	+/- to 1+	+/-			2+	2+
88-02-257 軟骨 marches 2SS		4+	3-4+	2-3+	1-2+			1+	3-4+
呼吸器系									
93-05-A203 N. 肺		-ve-2+	-ve-1+	+/-	-ve			2+	3+

表 X 続き

		精製 GV97							
腫瘍組織	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml 又は 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97/ supt.	GV1 4	GV39	GV59 supt.
92-12-A263 N. 気管支		2-3+ w/管 3-4+ 糸	1-2+ w/管 2-3+ 糸	-ve	-ve				2-3+

表 XI. 6-8週齢GP組織における直接免疫組織化学的染色による9F7抗VIFGFの染色パターン

		精製 GV97						
組織	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml 3F9 2ug/ml	0.5 ug/ml	9F7 supt.	3F9 supt.	5F9 supt.
消化管系								
肝臓		2+	1-2+	+/-	+/-		1-2+	1-2+
腸	4+	3+	2+	1+			4+m リンパ系 残りは 3F9 diff.	4+m リンパ系 残りは 3F9 diff.
脾臓	多数の1+ リンパ系細胞の 小島において 3+							
小腸	多数の4+ リンパ系 において 4+	多数の2-3+ リンパ系 において4+、 残りは 3F9 diff.	多数の1-2+ リンパ系 において4+、 残りは 3F9 diff.	多数の1- リンパ系 において4+、 残りは 3F9 diff.			いくつかの3+ リンパ系 において 4+	いくつかの 3+ および リンパ系に おいて4+

表 XI 続き

組織	20 ug/ml	精製 GV97		1ug/ml 3F9 2ug/ml	0.5 ug/ml	9F7 supt.	3F9 supt.	5F9 supt.
		10ug/ml	5ug/ml					
胃	3-4+	ほとんど1-2 おいて 3+	大部分で 1- おいて 2+	大部分で1- おいて1+			3-4+ (いくつかの FVIII-ve)	3-4+ (いくつかの FVIII-ve)
生殖系								
精巣								
筋肉および骨系								
心臓	-ve	-ve	-ve	-ve			3-4+ (いくつかの FVIII-ve)	3-4+ (いくつかの FVIII-ve)
筋肉								
皮膚	脂肪層にお いて1-2+お いて細胞層に おいて3-4+	脂肪層に おいて1+ おいて細胞 層において 3-4	脂肪層に おいて1- おいて細胞 層において 少数の3-4	脂肪層にお いて1- おいて細胞 層において 少数の1-2+			3+	3+

表 XI 続き

	精製 GV97							
組織	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml 又は 2ug/ml	0.5 ug/ml	9F7 supt.	3F9 supt.	5F9 supt.
免疫系								
脾臓	4+	3+	2+	-ve			4+	4+
胸腺								
泌尿器系								
腎臓	糸球体 4+	糸球体 3-4+	糸球体 2-3+	糸球体 1-2+			糸球体 3-4+	糸球体 3-4+
内分泌系								
副腎								
呼吸器系								
肺								
神経系								
小脳	4+	2+	大部分の +/- および 少数の+	大部分の+ および 少数の+			4+	4+

表 XI 続き

	精製 GV97							
組織	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml 又は 2ug/ml	0.5 ug/ml	9F7 supt.	3F9 supt.	5F9 supt.
腫瘍								
腫瘍	4+	4+	3-4+	2-3+(2)		4+		3+

(B. GV97の可溶性ヒトVEGFとの反応性の欠失) VEGF、VEGFレセプター(F1k-1)またはレセプターに結合(または複合体化)したVEGFに特異的である抗体を同定するために、ELISAスクリーニングプロトコルを開発した。手順は以下の通りである:最初に、96ウェルELISAプレート(丸底)を、感作緩衝液中の $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の $100\mu\text{l}$ /ウェルのFLK/seapで被覆した(外側のウェルはブランクのままにした)。一晩のインキュベーション後、このプレートを、一晩の間 4°C にて、PBSで2回洗浄した。次に、FLK/Seap被覆したプレートを、 $250\mu\text{l}$ /ウェルのPBS+CAH(5%)溶液で1時間 37°C にてブロックした。ブロッキング溶液を除去し、プレートを、ペーパータオル上で勢いよく叩いた。

【0668】次いでブロックしたプレートを、結合において $2\mu\text{g}/\text{ml}$ で $100\mu\text{l}$ /ウェルのVEGF-165(Dr. Ramakrishnan, University of Minnesotaから入手した酵母において生成されたVEGF165 aa形態)+ $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ ヘパリンとともに室温で4時間または 4°C で一晩インキュベートした。VEGF溶液を回収し、そ

してプレートをPBS-tween(0.10%)で2回洗浄した。次に、 $100\mu\text{l}$ /ウェルのハイブリドーマ融合上清をウェルに添加し、そして1時間 32°C にてインキュベートした。この上清のインキュベーションの後、プレートをPBS-tweenで3回洗浄し、次いでPBS-tween+CAH(5%)中に1:1000で、 $100\mu\text{l}$ ウェルの二次抗体(KPL, Gt抗マウスIgG)とともに1時間 37°C にてインキュベートした。

【0669】二次抗体とのインキュベーションの後、プレートを、PBS-tweenで4回洗浄し、 $100\mu\text{l}$ /ウェルの基質(クエン酸緩衝液+ H_2O_2 に溶解したSubstrate Sigma OPD)とともに20分間インキュベートし、そしてCambridge Technology Microplate Reader(Model 7520)において490nmで読み取った。適切なコントロールウェルより高い吸光度を有するウェルを、ポジティブとして選択し、そしてさらに特徴付けた。

【0670】GV97は、組換えVEGF被覆ELISAプレートに結合せず、しかも組換えヒトVEGFは、

GV97被覆したELISAプレートに結合しないことを見出した。可溶性組換えヒトVEGFは、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加された場合でさえ、組織学的な切片における腫瘍内皮への $5\mu\text{g}/\text{ml}$ GV97の結合をブロックしなかった。

【0671】これらのデータは、組換えヒトVEGFにおいて隠されるが、VEGFが内皮細胞上のそのレセプターに結合すると接近可能になるVEGFのエピトープを、GV97が認識することを示唆している。

【0672】(C. 株10保有モルモットにおけるGV97局在化) 組織学的切片から得られた染色データとは対照的に、GV97抗体は、株10腫瘍保有モルモットへの注射の後、腫瘍内皮細胞に選択的に局在化した(表

XII)。この腫瘍における内皮細胞の染色は、中程度の強さであったが、一方、種々の器官における正常な内皮の染色は、検出不能であった。

【0673】(D. 抗-bFGFは、腫瘍内皮細胞に選択的に結合する) GV97およびGF82(これらは、モルモットbFGFのN末端に対して惹起された)は、モルモット株10腫瘍の凍結反応における内皮細胞および2つの型のヒト悪性腫瘍における内皮細胞に強く結合した(表XIII)。対照的に、種々のモルモット正常組織における内皮細胞の比較的弱い染色が観察された。

【0674】

【表15】

表 XII. 腫瘍保有モルモットに注射されたGV97

組 織	GV97 10 ug/ml	GV 97 20 ug/ml 注射された血清希釈量
消化器系		
肝 臓	2+	-ve
腸	3+	少数でおよそ 0.5-1+
脾臓	多数の+/- および 細胞の小島において2+	少数でおよそ 0.5-1+
小 腸	多数の2-3+ および リンパ系において4+ のこりはFVEより diff.	+/-
胃	大部分において1-2 それと 3+	少数でおよそ 0.5+
生殖系		
精巣		+/-
筋肉 および 外皮系		
心 臓	-ve	-ve
筋 肉		-ve
皮 膚	脂肪層において1+ および細胞層に おいて3-4+	
免疫系		
脾 臓	3+	少数 およそ 1+
胸 腺		
泌尿系		
腎 臓	糸球体 3-4+	
内分泌系		
副 腎	4+	-ve
呼吸器系		
肺	2+	-ve
神経系		

表 XII 続々

組織	GV97 10 ug/ml	GV 97 20 ug/ml 注射された 血清容量
小脳	2+	-ve
腫瘍		
腫瘍	4+	2-3+

【0675】

【表16】

表 XIII. エルモト組織における抗 GP 1GF抗体染色

GP 組織	GF 67	GF 82
消化器系		
肝臓	ND	ND
膵	+/-	+/-
脾臓	2-3+	2+
小腸	+/-	+/-
胃	ND	ND
生殖系		
精巣	ND	ND
筋肉および外皮系		
心臓	2-3+	1+
筋肉	+/-	1+
皮膚	ND	ND
免疫系		
脾臓	3+	-ve
胸腺		
泌尿系		
腎臓	1-2+	-ve
内分泌系		
副腎	1-2+	+/-
呼吸器系		
肺	1-2+	2-3+
神経系		
小脳	1+	-1+
腫瘍		
株 1 腫瘍	4+	4+
ヒト腫瘍		
クロレ親和細胞腫	4+	4+
神経鞘腫	4+	4+

(実施例XI)

(ヒト処置プロトコル) 本実施例は、本発明の二重特異性結合および凝固リガンドを用いるヒト処置プロトコルに関する。これらのリガンドは、種々のヒトのガンおよびさらに他の疾患（例えば、中期またはより長期の血流の停止が有利である、良性前立腺肥大症および慢性関節リウマチ）の臨床的処置における使用が意図される。

【0676】二重特異性リガンドは、抗腫瘍治療において特に有用な道具であると考えられている。動物研究を含む本明細書に示されるデータ、ならびにリンパ腫の処置（Glennieら、1988）、T細胞標的化（N

olanおよびKennedy、1990）および薬物標的化（Paulus、1985）に関する当該分野における知識から、適切な用量および処置法は、容易に開発され得る。

【0677】当然、広範な使用の前に、さらなる動物研究および臨床治験が行われる。患者の処置およびモニタリングを含む、臨床治験を行うための種々の要素は、本開示の見解から当業者に公知である。以下の情報は、このような治験を確立することにおける使用のための一般的な指針として示されている。

【0678】研究のために選択される患者は、従来の治

療の少なくとも1つの課程に応答し得ず、そして身体検査、研究室技術、またはX線撮影手順により決定される客観的に測定され得る疾患を有しなければならないことが意図される。マウスモノクローナル抗体部分が用いられる場合、患者は、マウス免疫グロブリンに対するアレルギーの病歴を有していないべきである。いかなる化学療法も、研究に入る少なくとも2週間前に止められるべきである。

【0679】二重特異性リガンド投与に関して、3つの管腔ポートを備える留置中心静脈カテーテル (indwelling central venous catheter with a triple lumen port) の使用において特定の利点が見出されると考えられる。二重特異性リガンドは、例えば、0.22 μ m フィルターを用いて濾過され、そして例えば、生理食塩水で、100mlの最終用量まで適切に希釈されるべきである。使用前に、試験試料もまた、同様の方法で濾過され、そしてその濃度は、 A_{280} を測定することにより濾過の前および後に評価されるべきである。予測される回収率は、87~99%の範囲内であるべきであり、次いでタンパク質損失のための調整が説明され得る。

【0680】二重特異性リガンドは、各患者に2~7日間隔に2~4回の注入で、約4~24時間の期間にわたって投与され得る。投与はまた、7日間にわたる定常速度の注入により実施され得る。任意の用量レベルで与えられる注入は、観察される任意の毒性に依存するべきである。従って、グレードII毒性が、任意の単回の注入後、または定常速度の注入の特定の期間に達成された場合、毒性が改善されない限り、さらなる用量は差し控えられるか、または定常速度の注入は停止されるべきである。増加した用量の二重特異性凝固リガンドは、任意のカテゴリーにおいて、患者の約60%が受容し得ないグレードIIIまたはグレードIV毒性を示すまで患者の群に投与されるべきである。この値の2/3である用量は、安全な用量として定義され得る。

【0681】身体検査、腫瘍測定、および臨床検査は、勿論、処置の前にそして一ヶ月後までの間隔で実施されるべきである。臨床試験は、全血球数、血清クレアチニン、クレアチンキナーゼ、電解質、尿素、窒素、SGOT、ビリルビン、アルブミン、および総血清タンパク質を含むべきである。処置後60日までに採取される血清試料は、完全な二重特異性リガンドまたはその成分およびリガンドのいずれかまたは両方の部分に対する抗体の存在についてラジオイムノアッセイにより評価されるべきである。任意の標準的なアッセイ (例えば、ELIS

AまたはRIA) を用いる、血清の免疫学的分析は、治療薬剤の薬物動態学およびクリアランスの評価を可能にする。

【0682】抗腫瘍応答を評価するために、患者は、最後の注入から48時間~1週間に検査され、そして30日後に再び検査されるべきであることが意図される。触知可能な疾患が存在する場合、全ての塊の2つの垂直直径は、処置の間毎日、治療の完了後1週間以内、および30日目に測定されるべきである。触知不可能な疾患を測定するために、一連のCTスキャンが、48時間~1週間目に、そして30日目に再び、胸部、腹部、および骨盤を通して1-cm間隔で実施され得る。組織試料はまた、疾患部位からの生検、あるいは適切である場合は、血液または液体試料までも用いて、組織学的に、および/またはフローサイトメトリーにより評価されるべきである。

【0683】臨床的な応答は、条件にあった尺度により定義され得る。例えば、完全な応答は、処置1ヶ月後の全ての測定可能な腫瘍の消失により定義され得る。一方、部分的な応答は、全ての腫瘍部位が拡大を示さない、処置1ヶ月後の全ての評価し得る腫瘍結節の直角をなす直径の積の合計の50%以上の減少により定義され得る。同様に、混合応答は、1つ以上の部位における進行を伴って、処置1ヶ月後の全ての測定可能な病巣の直角をなす直径の積の50%以上の減少により定義され得る。

【0684】本明細書中で開示および請求される全ての組成物および方法は、本開示の見解から、過度の実験を要することなく作製および遂行され得る。本発明の組成物および方法は、好ましい実施態様に関して記載されているが、改変が、本発明の概念、精神、および範囲を逸脱することなく、本明細書中に開示される組成物、方法、および方法の工程または一連の工程に適用され得ることは当業者に明らかである。さらに詳細には、化学的および生理学的の両方で関連する特定の薬剤が、同一または類似した結果が達成されながら本明細書中に記載される薬剤に代用され得ることは明らかである。当業者に明らかな全てのこのような類似した置換および改変は、添付の請求の範囲により定義される本発明の精神、範囲、および概念内にあると考えられる。

【0685】(参考文献) 以下の参考文献は、これらの文献が本明細書に述べられている事柄の例示的な手順または他の詳細な追加事項を提供する範囲で、本明細書中に参考として援用される。

【0686】

【表17】

Abbassi et al., J Clin Invest, 92(6):2719-30, 1993.

Abraham et al., Science, 233:545-548, 1986.

Abrams & Oldham, Monoclonal antibody therapy of human cancer, Foon & Morgan (Eds.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 103-120, 1985.

Adams et al., *Cancer Res.*, 43:6297, 1983.

Adelman et al., *DNA* 2:183, 1983.

Alvarez et al., *Modern Pathology*, 5(3):303-307, 1992.

Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

Arklie et al., *Int. J. Cancer*, 28:23, 1981.

Ashall et al., *Lancet*, 2(8288):7-10, 1982.

Atkinson et al., *Cancer Res.*, 62:6820, 1982.

Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989.

Bach et al., *Biochemistry*, 25, 4007-4020, 1986.

Bauer et al., *Vox Sang*, 61:156-157, 1991.

Baxter et al., *Micro. Res.*, 41(1):5-23, 1991.

Bevilacqua et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:9238-9242, 1987.

Bhagwa et al., *Nature*, 316:511-513, 1985.

Bhattacharya et al., *Hybridoma*, 4:153, 1985.

Bhattacharya et al., *Cancer Res.*, 44:4528, 1984.

Bicknell and Harris, *Seminars in Cancer Biology*, 3:399-407, 1992.

Bikfalvi et al., *Exp. Cell Res.*, 181:75-84, 1989.

Birembaut et al., *J. Pathology*, 145:283-296, 1985.

Bittner et al., *Methods in Enzymol.*, 153:516-544, 1987.

Bjorndahl et al., *Eur. J. Immunol.*, 19:881-887, 1989.

Blakey et al., *Biochem Biophys ACTA*, 923Y(1):59-65, 1987b.

Blakey et al., *Cancer Res.*, 47:947-952, 1987a.

Bolhuis et al., *J. Immunol.*, 149:1840-1846, 1992.

Borden et al., *Cancer*, 65:800-814, 1990.

Brennan et al., *Science*, 229:81-83, 1985.

Brinkmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88(19):8616-20, 1991.

Brooks et al., *Cell*, 79:1157-1164, 1994.

Brooks et al., *Science*, 264:569-571, 1994.

Brown et al., *J. Exp. Med.*, 176:1375-1379, 1992.

Brown et al., *PNAS*, 78:539, 1981a.

Brown et al., *J. Immunol.*, 127:539, 1981b.

Brown et al., *Cancer Res.*, 53:4727-4735, 1993.

Broze, *Seminars in Hematol.*, 29:159-169, 1992.

Bruland et al., *Cancer Research*, 48:5302-5309, 1988.

Bruland et al., *Int. J. Cancer*, 38(1):27-31, 1986.

Bühring et al., *Leukemia*, 5:841-847, 1991.

Burchell et al., *J. Immunol.*, 131(1):508-13, 1983.

Burrows, & Thorpe, *PNAS*, 90:8996-9000, 1993.

Burrows et al., *Cancer Res*, 52:5954-5962, 1992.

Burrows et al., *Cancer Res.*, 51:4768-4775, 1991.

Burrows et al., *Clin. Cancer Res.*, 1995 (in press).

Burtin et al., *Cancer*, 31:719-726, 1983.

Byers & Baldwin, *Immunol*, 65:329-335, 1988.

Byers et al., *Cancer Res.*, 49:6153-6160, 1989.

Byers et al., 2nd Int. Conf. Mab Immunoon., *Cancer*, 41:1987.

Campbell, In: Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13, Burden & Von Knippenberg (Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 75-83, 1984

Carnemolla et al., *J. Cell Biol.*, 108:1139-1148, 1989.

- Carnemolla et al., *J. Biol. Chem.*, 267(34):24689-24692, 1992.
- Carrel et al., *Hybridoma*, 1:387, 1982.
- Cavenagh et al., *Br J Haematol*, 85(2):285-91, 1993.
- Chapman et al., *Arthritis Rheum*, 37(12):1752-6, 1994.
- Chee et al., *Cancer Res.*, 43:3142, 1982.
- Chen et al., *J. Immunol*, 145:8-12, 1990.
- Cherwinski et al., *J. Exp. Med.*, 166:1229-1244, 1989.
- Cheung et al., *Proc. AACR*, 27:318, 1986.
- Clark et al., *Biochim. Biophys. ACTA*, 867:244-251, 1986.
- Clark et al., *Cancer Res.*, 51:944-948, 1991.
- Clark et al., *Int. J. Cancer*, 2:15-17, 1988.
- Clauss et al., *J. Exp. Med.*, 172:1535-1545, 1990.
- Cohn et al., *Arch. Surg.*, 122:1425, 1987.
- Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150:1, 1981.
- Colcher et al., *Cancer Invest*, 1:127, 1983.
- Colcher et al., *Cancer Res.*, 47:1185 and 4218, 1987.
- Colcher et al., *PNAS*, 78:3199, 1981.

- Collins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:4917-4921, 1984.
- Conn et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2628-2632, 1990.
- Connolly et al., *J. Biol. Chem.*, 264(33):20017-20024, 1989.
- Corgon-Cardo et al., *Laboratory Investigation*, 63(6):832-840, 1990.
- Corvalan, *Cancer Immuno.*, 24:133, 1987.
- Cotran et al., *J. Exp. Med.*, 164:661-666, 1986.
- Crea et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 75:5765, 1978.
- Croghan et al., *Cancer Res.*, 43:4980, 1983.
- Croghan et al., *Cancer Res.*, 44:1954, 1984.
- Daar et al., *Transplantation*, 38(3):293-298, 1984.
- Davies and Wlodawer, *FASEB J.*, 9:50-56, 1995.
- Davis & Preston, *Analytical Biochemistry*, 116(2):402-407, 1981.
- de Krester et al., *Int. J. Cancer*, 37:705, 1986.
- De Vries et al., *Science*, 255:989-991, 1992.
- DeFranco, *Nature*, 352:754-755, 1991.

- deLeij et al., Bispecific antibodies and targeted cellular cytotoxicity, Romei-Lemonne et al., p. 249, 1991.
- Denekamp, et al., *Brit. J. Cancer*, 46:711-720, 1982.
- Denekamp, *Cancer Meta. Rev.*, 9:267-282, 1990.
- Denekamp, *Prog. Appl. Microcirc.*, 4:28-38, 1984.
- Detmar et al., *J. Exp. Med.*, 180:1141-1146, 1994.
- Dewerchin et al., *Blood*, 78(4):1005-1018, 1991.
- Di Scipio et al., *Biochemistry*, 16:5253-5260, 1977.
- Gillman et al., *Antibody, Immunocon. Radiopharm.*, 1:65-77, 1988.
- Gippold et al., *PNAS*, 77:6115, 1980.
- Gixon et al., *Mol. & Cell Biol.*, 7:4896-4902, 1989.
- Grijvestijn et al., *J. Immunol.*, 138:713-719, 1987.
- Hunham & Stewart, *J. Natl. Cancer Inst.*, 13:1299-1377, 1953.
- Hustin et al., *J. Immunol.*, 137:241-254, 1986.
- Dvorak et al., *J. Exp. Med.*, 174:1275-1278, 1991.
- Dvorak et al., *Cancer Cells*, 3(3):77-85, 1991.
- Edelman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1513-1517, 1993.

- Edgington et al., *Thrombosis and Haemostasis*, 66(1):67-79, 1991.
- Ellis et al., *Histopathol.*, 8:501, 1984.
- Embleton et al., *Br. J. Cancer*, 63(5):670-674, 1991.
- Epenetos et al., *Cancer Res.*, 46:3183-3191, 1986.
- Epenetos et al., *Lancet*, Nov. 6, 2:1000-1004, 1982.
- Fair et al., *J. Biol. Chem.*, 262, 11692-11698, 1987.
- Farrans et al., *Lancet*, 2:397, 1982.
- Febbraio and Silverstein, *J. Biol. Chem.*, 265(30):18531-18537, 1990.
- Ferrara et al., *J. Cell. Biochem.*, 47:211-218, 1991.
- Ferrara et al., *Endocrine Reviews*, 13(1):18-32, 1992.
- Fisher et al., *Thrombosis Research*, 48:89-99, 1987.
- Flavell et al., *Br. J. Cancer*, 65:545-551, 1992.
- Flavell et al., *Br. J. Cancer*, 64(2):274-280, 1991.
- Folkman, *Adv. Cancer Res.*, 43:175-230, 1985a.
- Folkman et al., *Ann. Surg.*, 214(4):414-427, 1991.
- Folkman, In: Important Advances in Oncology. Part I.
DeVita et al. (Eds.), JB Lippincott, Philadelphia, pp.
42-62, 1985b.

Poster et al., *Virchows Arch. (Pathol. Anat. Histopathol.)*, 394:295, 1982.

Poster et al., *Human Pathol.*, 15:502 1984.

Fox, et al., *J. Biol. Resp.*, 9:499-511, 1990.

Frelinger III et al., *J. Biol. Chem.*, 266(26):17106-17111, 1991.

Frelinger III et al., *J. Biol. Chem.*, 265(11):6346-6352, 1990.

French et al., *Cancer Res.*, 51:2358-2361, 1991.

Gailani and Broze, Jr., *Science*, 253:909-912, 1991.

Galfre et al., *Methods Enzymol.*, 73:1-46, 1981.

Gallagher et al., *J. Surg. Res.*, 40:159, 1986.

Galland et al., ???????, 1233-1240, 1993.

Gangopadhyay et al., *Cancer Res.*, 45:1744, 1985.

Gefter et al., *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.

Geppert et al., *Immunological Reviews*, 117:5-66, 1990.

Ghetie et al., *Cancer Res.*, 51:5876-5880, 1991.

Ghose, *CRC Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 3:262-359, 1982.

Ghose & Blair, *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 3:262-359, 1987.

Gibbons, In: J.D.Gibbons (ed.), "Nonparametric methods for quantitative analysis," pp. 160, New York: Holt, Rinehart and Winston. 1976.

Gitoy-Goren et. al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 190:702-, 1993

Glassy et al., PNAS, 80:63227, 1983.

Glennie et al., J. Immunol., 141(10):3662-3670, 1988.

Glennie et al., J. Immunol., 139:2367-2375, 1987.

Goding, In: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., Academic Press, Orlando, FL, pp. 60-61, 65-66, 71-74, 1986.

Gomez-Pinilla and Cotman, Neuroscience, 49:771-780, 1992.

Gosset et al., Int Arch Allergy Immunol, 106(1):69-77, 1995.

Gougos et al., Int. Immunol., 4:83-92, 1992.

Gougos & Letarte, J. Immunol., 141:1925-1933, 1988.

Griffin et al., Treat. Res., 37:433-455, 1988b.

Griffin et al., Proc. 2nd Conf. on Radioimmunodetection & Therapy of Cancer, 82, 1988a.

Groenewegen et al., Nature, 316:361-363, 1985.

Groves et al., Br J Dermatol, 124(2):117-23, 1991.

Gusterson et al., Br. J. Cancer, 58:453, 1988.

Hagemeier et al., *Int. J. Cancer*, 38:481-488, 1986.

Hakkert et al., *Blood*, 78(10):2721-6, 1991.

Hammerling, *Transplant. Rev.*, 30:64-82, 1976.

Hattey et al., *Thrombosis Research*, 45(5):485-495, 1987.

Hayes et al., *J. Clin. Invest.*, 75:1671, 1985.

Hayward et al., *Biological Chemistry*, 266(11):7114-7120, 1991.

Hendler et al., *Trans. Assoc. Am. Physicians*, 94:217, 1981.

Herblin and Gross, *Angiogenesis: Key Principles - Science - Technology - Medicine*, 214-218, 1992.

Hess et al., *Transplantation*, 6:1232-1240, 1991.

Heynen et al., *J. Clin. Invest.*, 94:1098-1112, 1994.

Horan Hand et al., *Cancer Res.*, 45:2713, 1985.

Howard et al., *Developmental Biology*, 146:325-338, 1991.

Huang et al., *Anticancer Research*, 13:887-890, 1993.

Imai et al., *JNCI*, 68:761, 1982.

Imam et al., *J. Immunobiol.*, 1984.

Inouye et al., *Nucleic Acids Res.*, 13:3101-3109, 1985.

Jain, *Cancer Meta. Rev.*, 9(3):253-266, 1990.

Jakeman et al., *J. Clin. Invest.*, 89:244-253, 1992.

Johnson & Reithmuller, *Hybridoma*, 1:351, 1982.

Johnson et al., *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1:246, 1981

June et al., *Molecular Cell Biology*, 12:4472-4481, 1987.

June et al., *Immunology Today*, 11(6):211-216, 1990.

Jutila et al., *J Exp Med*, 175(6):1565-73, 1992.

Juweid et al., *Cancer Res.*, 52:5144-5153, 1992.

Kabawat et al., *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 4:245, 1985.

Kabawat et al., *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 4:265, 1983.

Kandel et al., *Cell*, 66:1095-1104, 1991.

Kantor et al., *Hybridoma*, 1:473, 1982.

Karasek, *J. Invest. Derm.*, 93(2):335-385, 1989.

Keelan et al., *Am J Physiol*, 266(1 Pt 2) pR276-90, Jan 1994a.

Keelan et al., *J Nucl Med*, 35(2):276-81, Feb 1994b.

Kenner et al., *Cancer Res.*, 51:1529-1536, 1991.

Kim et. al., *Growth Factors*, 7:53-64, 1992.

Kim et al., *Nature*, 362:841-844, 1993.

Kimura et al., *Immunogenetics*, 11:373-381, 1983.

- Kinsel et al., *Cancer Res.*, 49:1052, 1989.
- Kishimoto et al., *Blood*, 78(3):805-11, 1991.
- Kisiel, *J. Biol. Chem.*, 254(23):12230-12234, 1979.
- Kjeldsen et al., 2nd Int. Wkshop of MAb's & Breast Cancer, San Fran., Nov., 1986.
- Klagsbrun & Folkman, Angiogenesis Handook of Experimental Pharmacology, Vol. 95, Sporn & Roberts, Springer-Verlag, Berlin, pp. 549-586, 1990.
- Kohler & Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975.
- Kohler & Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976.
- Kondo et al., *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 194(3):1234-1241, 1993.
- Krishnaswamy et al., *J. Biol. Chem.*, 267(36):26110-26120, 1992.
- Krishnaswamy et al., *J. Biol. Chem.*, 267(33):23696-23706, 1992.
- Kufe et al., *Hybridoma*, 3:223, 1984.
- Lan et al., *Cancer Res.*, 44:1954, 1984.
- Lan et al., *Cancer Res.*, 45:305, 1985.
- Lee et al., *Methods in Enzymology*, 237:146-164, 1994.
- Leith et al., *British J. Cancer*, 66(2):345-8, 1992.

- Lemkin et al., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 3:47, 1984.
- Leung et al., *Science*, 246:1306-1309, 1989.
- Leyden et al., *Cancer*, 57:1135, 1986.
- LoBuglio et al., *JNCI*, 80:932, 1988.
- Logan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3655-3659, 1984.
- Loop et al., *Int. J. Cancer*, 27:775, 1981.
- Lord et al., In: Genetically Engineered Toxins, Frank (Ed.), M. Dekker Publ., p. 183, 1992.
- Lowder et al., *Blood*, 69:199-210, 1987.
- Lowe et al., *Immunol Lett.*, 12:263-269, 1986.
- Lowy et al., *Cell*, 22:817, 1980.
- Maeda et al., *J. Invest. Derm.*, 97:183-189, 1991.
- Manabe et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 104(3):445-454, 1984.
- Mandeville et al., *Cancer Detect. Prev.*, 10:89, 1987.
- Mann, *TIPS* 12, 229-233, 1987.
- Mason & Williams, *Biochem J*, 187:1-20, 1980.
- Massoglia et al., *J. Cell. Phys.*, 132:531-537, 1987.
- Masuko et al., *Cancer Res.*, 44:2813, 1984.

Mattes et al., *PNAS*, 81:568, 1984.

Mazzocchi et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 32:13-21, 1990.

McDicken et al., *Br. J. Cancer*, 52:59, 1985.

Menard et al., *Cancer Res.*, 63:1295, 1983.

Messing et al., *Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA*, Editor A. Walton, Elsevier, Amsterdam, 1981.

Metzelaar et al., *Blood*, 79(2):372-379, 1992.

Metzelaar et al., *J. Biol. Chem.*, 266(5):3239-3245, 1991.

Mignatti et al., *J. Cell. Biol.*, 113:1193-1201, 1991.

Millauer et al., *Cell*, 72:835-846, 1993.

Miotti et al., *Cancer Res.*, 65:826, 1985.

Miotti et al., *Int. J. Cancer*, 39:297, 1987.

Montefort et al., *Eur Respir J*, 5(7):815-23, 1992.

Moroi and Aoki, *J. Biol. Chem.*, 251(19):5956-5965, 1976.

Morrissey et al., *Blood*, 81:734-744, 1993.

Morrissey et al., *Cell*, 50:129-135, 1987.

Morrissey et al., *Thrombosis Res.*, 52:247-261, 1988.

Moughal et al., *J Periodontal Res*, 27(6):623-30, 1992.

Mulligan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072, 1981.

Mulligan et al., *J. Clin. Invest.*, 88:1396-1406, 1991

Munz et al., *J. Nucl. Med.*, 27:1739, 1986.

Murray et al., *Radio. Onc.*, 16:221-234, 1989.

Nabel et al., *Nature*, 362:844-846, 1993.

Nakamura, *Prog. Growth Factor Res.*, 3:67-86, 1991.

Nelson, 1991.

Nemerson, *Blood*, 71(1):1-6, 1988.

Neumann et al., *Arch Dermatol*, 130(7):879-83, 1994.

Nieuwenhuis et al., *Blood*, 70(3):838-845, 1987.

Nishikawa et al., *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 324:131-139, 1992.

Nitta et al., *Lancet*, 335:368-371, 1990.

Nolan & Kennedy, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1040:1-11, 1990.

Norton et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 195(1):250-8, 1993.

O'Connell et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 90:154-159, 1992.

O'Connell et al., *J. Immunol.*, 144(2):521-525, 1990.

O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1527, 1981.

Ogawa et al., *British J. Haematology*, 75:517-524, 1990.

Ohuchida et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 103(15):4597-4599, 1981.

Oi & Morrison, *Mt. Sinai J. Med.*, 53(3):175-180, 1986.

Olander et al., *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 175(1):69-76, 1991.

Olofsson et al., *Blood*, 84(8):2749-58, 1994.

Osborn et al., *Cell*, 59:1203-1211, 1989.

Osterud et al., *Thrombosis Res.*, 42:323-329, 1986.

Paborsky et al., *J. Biol. Chem.*, 266(32):21911-21916, 1991.

Palleroni et al., *Int. J. Cancer*, 49:296-302, 1991.

Patt et al., *Cancer Bull.*, 40:218, 1988.

Paul et al., *Hybridoma*, 5:171, 1986.

Paulus, *Dehrini Inst. Mitt.*, 78:118-132, 1985.

Perez et al., *J. Exp. Med.*, 163:166-178, 1986.

Perez et al., *J. Immunol.*, 137:2069-2072, 1986.

Perez et al., *Nature*, 316:354-356, 1985.

Perkins et al., *Eur. J. Nucl. Med.*, 10:296, 1985.

Pietersz et al., *Antibody, Immunoconj. Radiopharm.*, 1:79-103, 1988.

Pimm et al., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 118:367-370, 1992.

Plate et al., *Cancer Res.*, 53:5822-5827, 1993.

Plate et al., *Nature*, 359:845-848, 1992.

Pober et al., *J. Exp. Med.*, 157:1339-1353, 1991.

Poels et al., *J. Natl. Cancer Res.*, 44:4528, 1984.

Poels et al., *J. Natl. Cancer*, 76:781, 1986.

Pukrittayakamee et al., *Mol. Biol. Med.*, 1:123-135, 1983.

Qian et al., *Cancer Res.*, 140:3250, 1991.

Rao and Rapaport, *Biochemistry*, 85:6687-6691, 1988.

Rasmussen et al., *Breast Cancer Res. Treat.*; 2:401, 1982.

Rehemtulla et al., *Thrombosis and Haemostasis*, 65(5):521-527, 1991.

Reilly et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164:736-743, 1989.

Reisfeld et al., *Melanoma Antigens and Antibodies*, p. 317, 1982.

Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack Publishing Company, 1980.

Rettig et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10832-10836, 1992.

Riva et al., *Int. J. Cancer*, 2:114, 1988

Rivoltini et al., *3rd Int. Conf. Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity*, 1992.

Rowinsky, *Clinical Investigation, Abstracts from Chemotherapy foundation symposium X. Innovative cancer chemotherapy for tomorrow*, pp. 6-9, 1992.

Ruco et al., *Am. J Pathol.*, 137(5):1163-1171, 1990.

Ruf and Edgington, *Thrombosis and Haemostasis*, 66(5):529-533, 1991.

Ruf et al., *J. Biol. Chem.*, 266(24):15719-15725, 1991.

Ruf et al., *J. Biol. Chem.*, 266(4):2158-2166, 1991.

Ruf et al., *JBC*, 266:2158-2166, 1991.

Ruf & Edgington, *FASEB J.*, 8:385-390, 1994.

Ruther et al., *EMBO J.*, 2:1791, 1983.

Safran et al., *Oncogene*, 5:635-643, 1990.

Sainsbury et al., *Lancet*, 1:364, 1985.

Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989.

Sands, *Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals*, 1:213-226, 1988.

- Santerre et al., *Gene*, 30:147, 1984.
- Saxton et al., *Hybridoma*, 1:433, 1982.
- Scarpati et al., *Biochemistry*, 26:5234-5238, 1987.
- Schlingemann et al., *Lab. Invest.*, 52:71-76, 1985.
- Schlingemann et al., *Lab. Invest.*, 62:690-696, 1990.
- Schlom et al., *Adv. Cancer Res.*, 43:143, 1985.
- Schutt et al., *Immunol. Lett.*, 19:321-328, 1988.
- Schweigerer et al., *Nature*, 325:257-259, 1987.
- Sedmak et al., *Transplantation*, 58(12):1379-85, 1994.
- Segal et al., 1992.
- Senger et al., *Cancer and Metastasis Reviews*, 12:303-324, 1993.
- Senger et al., *Cancer Research*, 50:1774-1778, 1990.
- Shankar et al., *J. Biol. Chem.*, 269(19):13936-13941, 1994.
- Shen and Tai, *J. Biol. Chem.*, 261(25):11585-11591, 1986.
- Shepard et al., *J. Clin. Immunol.*, 11:117-127, 1991.
- Shockley et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 617:367-382, 1991.
- Shrestha et al., *Eur. J. Cancer B. Oral. Oncol.*, 30B(6):393-9, 1994.

- Shweiki et al., *Nature*, 359:843-847, 1992.
- Silber et al., *J Clin Invest*, 93(4):1554-63, 1994.
- Silverstein and Febbraio, *Blood*, 80(6):1470-1475, 1992.
- Sioussat et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 301(1):15-20, 1993.
- Sloane, *Cancer*, 17:1786, 1981.
- Smith et al., *J. Virol.*, 46:584, 1983.
- Smith et al., 1989.
- Smith et al., *Proc. Am. Soc. Clin. O. col.*, 6:250, 1987.
- Soule et al., *PNAS*, 80:1332, 1983
- Span et al., *Immunology*, 72(3):355-60, 1991.
- Spicer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:5148-5152, 1987.
- Sporn et al., *Blood*, 81(9):2406-12, 1993.
- Staerz et al., *Nature*, 314(6012):628-631, 1985.
- Stavrou, *Neurosurg. Rev.*, 13:7, 1990.
- Stefanik et al., *Cancer Research*, 51:5760-5765, 1991.
- Steinberg et al., *J Heart Lung Transplant*, 13(2):306-18, Mar-Apr 1994.

Stern et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:4119-4123, 1982.

Stern et al., *J. Biol. Chem.*, 260(11):6717-6722, 1985.

Stevenson et al., *Chem. Immunol.*, 48:126-156, 1990.

Street et al., *Cell. Immunol.*, 120:75-81, 1989.

Stuhlmiller et al., *Hybridoma*, 1:447, 1982.

Sugama et al., *J. Cell Biol.*, 119(4):935-944, 1992.

Sunderland et al., *Cancer Res.*, 44:4496, 1984.

Szybalska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:2026, 1952.

Szymendera, *Tumour Biology*, 7:333, 1986.

Takahashi et al., *Cancer*, 61:881, 1988.

Teramoto et al., *Cancer*, 50:241, 1982.

Tessler et al., *J. Biol. Chem.*, 269(17):12456-12461, 1994.

Thieme et al., *Diabetes*, 44(1):98-103, 1995.

Thompson et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 70:409, 1983.

Thor et al., *Cancer Res.*, 46:3116, 1986.

Thorpe et al., *Cancer Res.*, 48:6396-6403, 1988.

Ting et al., *J. Immunol.*, 141:741-748, 1988.

Tischer et al., *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*,
165(3):1198-1206, 1989.

Tischer et al., *J. Biol. Chem.*, 266(18):11947-11954,
1991.

Titus et al., *J. Immunol.*, 138:4018-4022, 1987.

Tomiyama et al., *Blood*, 79(9):2303-2312, 1992.

Tone et al., *J. Biochem.*, 102(5):1033-1041, 1987.

Tsuji et al., *Cancer Res.*, 45:2358, 1985.

Tuominen and Kallioinen, *J. Cutan. Pathol.* 21(5):424-9,
1994.

Tutt et al., *Eur. J. Immunol.*, 21:1351-1358, 1991.

Ugarova et al., *J. Biol. Chem.*, 268(28):21080-21087,
1993.

Ulich et al., *Inflammation*, 18(4):389-98, 1994.

Vaickus et al., *Cancer Invest.*, 9:195-209, 1991.

Vaisman et al., *J. Biol. Chem.*, 265(32):19461-19466,
1990.

Van Heeke et al., *J. Biol. Chem.*, 264:5503-5509, 1989.

Van Duk et al., *Int. J. Cancer*, 43:344-349, 1989.

Veale et al., *Arthritis Rheum*, 36(7):893-900, 1993.

Venkateswaran et al., *Hybridoma*, 11(6):729-739, 1992.

Vitetta et al., *Cancer Res.*, 15:4052-4058, 1991.

von Asmuth et al., *Eur J Immunol*, 22(10):2519-26, 1992.

Wagener et al., *Int. J. Cancer*, 33:469, 1984.

Wang et al., *Int. J. Cancer*, 54:363-370, 1993.

Wang et al., *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*,
177(1):286-291, 1991.

Warr et al., *Blood*, 75:1481-1489, 1990.

Watanabe et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,
86:9456-9460, 1989.

Wawrzyniak & Thorpe, "Methods for preparing
immunotoxins: effect of the linkage on activity and
stability", in: Immunoconjugates: Antibody conjugates
in radioimaging and therapy of cancer, Vogel (ed), New
York, Oxford University Press, pp. 28-55, 1987.

Weiner et al., *Cancer Res.*, 49:4062-4067, 1989.

Weiss et al., *Blood*, 73:968-975, 1989.

Whittle et al., *Nature*, 292:472-474, 1981.

Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:3567, 1980.

Wigler et al., *Cell*, 11:223, 1977.

Wildgoose et al., *Blood*, 80:25-28, 1992.

Williams and Esnouf, *Biochem. J.*, 84:52-62, 1962.

Wilson et al., *Int. J. Cancer*, 28:293, 1981.

Wiman and Collen, *Eur. J. Biochem.*, 78:19-26, 1977.

Wiman, *Biochem. J.*, 191:229-232, 1980.

Winter & Milstein, *Nature*, 349:293-299, 1991.

Woodbury et al., *PNAS*, 77:2183, 1980.

Wu et al., *Int. J. Pharm.*, 12:235-239, 1990.

Xu et al., *J. Biol. Chem.*, 267(25):17792-17803, 1992.

Yamaguchi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:484-488, 1994.

Yamaue et al., *Biotherapy*, 2:247-259, 1990.

Zamarron et al., *J. Biol. Chem.*, 266(24):16193-16199, 1991.

Zhang et al., *Int J Cancer*, 59(6):823-9, 1994.

【0687】

限された新規な組成物および方法が提供される。

【発明の効果】本発明により、特異的凝固、例えば、腫瘍血管系中の凝固を達成する使用のための、副作用が抑制される。

【0688】

【配列表】

(1) 一般的情報:

(i) 出願人:

名称: ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバーシティ オブ テキサス システム

番地: 201 ウェストセブンス ストリート

市: オースティン

州: テキサス

国: アメリカ合衆国

郵便番号: 7870

電話番号: (512) 499-4462

テレファックス: (512) 499-4523

および

名称: ザ スクリプス リサーチ インスティテュート

番地: 10666 ノース トレイ パインズ ロード

市: ラホヤ

州: カリフォルニア

国: アメリカ合衆国

郵便番号: 92037

(ii) 発明者: トープ, フィリップイー.

エジントン, トーマス エス.

(iii) 発明の名称: 血管系の特異的凝固のための方法および組成物

(iv) 配列数: 32

(v) 連絡住所:

- (A) 名称: アーノルド, ホワイト アンド ダーキー
- (B) 番地: ピー.オー. ボックス 4433
- (C) 市: ヒューストン
- (D) 州: テキサス
- (E) 国: アメリカ合衆国
- (F) 郵便番号: 77210

(vi) コンピューター読み出し形態:

- (A) 媒体型: フロッピー (登録商標) ディスク
- (B) コンピューター: IBM PC 互換用
- (C) OS: PC-DOS/MS-DOS, ASCII

(vii) 現在の出願データ:

- (A) 出願番号: PCT/US95/07439
- (B) 出願日: 1995年6月7日
- (C) 分類: 不明

(viii) 先願データ:

- (A) 出願番号: US08/273,567
- (B) 出願日: 1994年7月11日

(ix) 代理人/事務所情報:

- (A) 氏名: パーカー, デビットエル.
- (B) 登録番号: 32,165
- (C) 照会/記録番号: UTFD43P---

(x) 電話回線情報:

- (A) 電話: (512)418-3000
- (B) テレファックス: (713)789-2679
- (C) テレックス: 79-0924

(2) 配列番号1の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 27 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

- (A) 説明: /desc = 「DNA」

(xi) 配列: 配列番号1:

GTCATGCCAT GGCCTCAGGCACTACAA

27

(2) 配列番号2の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 32 塩基対
- (B) 型: 核酸

- (C) 鎖の数： 一本鎖
(D) トポロジー： 直鎖状
(ii) 配列の種類： 他の核酸
(A) 説明： /desc = 「DNA」
(xi) 配列： 配列番号2：
TGACAAGCTT ATTCTCTGAA TTCCCCCTTTCT 32
- (2) 配列番号3の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ： 47 塩基対
(B) 型： 核酸
(C) 鎖の数： 一本鎖
(D) トポロジー： 直鎖状
(ii) 配列の種類： 他の核酸
(A) 説明： /desc = 「DNA」
(xi) 配列： 配列番号3：
GTCATGCCAT GGCCCTGGTG CCTCGTGCTT CTGGCACTACAAATACT 47
- (2) 配列番号4の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ： 38 塩基対
(B) 型： 核酸
(C) 鎖の数： 一本鎖
(D) トポロジー： 直鎖状
(ii) 配列の種類： 他の核酸
(A) 説明： /desc = 「DNA」
(xi) 配列： 配列番号4：
GTCATGCCAT GGCCCTGCTCA GGCACTACAAATACTGTG 38
- (2) 配列番号5の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ： 50 塩基対
(B) 型： 核酸
(C) 鎖の数： 一本鎖
(D) トポロジー： 直鎖状
(ii) 配列の種類： 他の核酸
(A) 説明： /desc = 「DNA」
(xi) 配列： 配列番号5：
GTCATGCCAT GGCCCTGGTG CCTCGTGGTT CTTGCGGCACTACAAATACT 50
- (2) 配列番号6の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ： 35 塩基対
(B) 型： 核酸
(C) 鎖の数： 一本鎖
(D) トポロジー： 直鎖状
(ii) 配列の種類： 他の核酸
(A) 説明： /desc = 「DNA」
(xi) 配列： 配列番号6：
TGACAAGCTT AGCATTCTCT GAATCCCCCTTTCT 35

(2) 配列番号7の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 50 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

- (A) 説明: /desc = 「DNA」

(xi) 配列: 配列番号7:

GTCATGCCAT GGCCCTGGTG CCTCGTGGTT GCGGAGGCGGTGGATCAGGC 50

(2) 配列番号8の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 36 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

- (A) 説明: /desc = 「DNA」

(xi) 配列: 配列番号8:

AGTATTTGTA GTGCCTGAGG ATCCGCCACCTCCACT 36

(2) 配列番号9の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 45 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

- (A) 説明: /desc = 「DNA」

(xi) 配列: 配列番号9:

GGAGGCGGTG GATCAGGCGG TGGAGGTAGT GGAGGTGGCGGATCC 45

(2) 配列番号10の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 17 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

- (A) 説明: /desc = 「DNA」

(xi) 配列: 配列番号10:

GTCATGCCATGGCCCTG 17

(2) 配列番号11の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 32 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：他の核酸
(A) 説明：/desc = 「DNA」
(xi) 配列：配列番号11：
TGACAAGCTT ATTCTCTGAA TTCCCCCTTTCT 32

(2) 配列番号12の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：50塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：他の核酸
(A) 説明：/desc = 「DNA」
(xi) 配列：配列番号12：
GTCATGCCAT GGCCCTGGTG CCTCGTGGTT CTTGCGGCACTACAAATACT 50

(2) 配列番号13の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：53塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：他の核酸
(A) 説明：/desc = 「DNA」
(xi) 配列：配列番号13：
CGCGGATCCA CCGCCACCAG ATCCACCGCC TCCTTCTCTGAATTCCCCTT TCT 53

(2) 配列番号14の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：44塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：他の核酸
(A) 説明：/desc = 「DNA」
(xi) 配列：配列番号14：
CGCGGATCCG GCGGTGGAGG CTCTTCAGGC ACTACAAATACTGT 44

(2) 配列番号15の情報：
(i) 配列の特色：
(A) 長さ：31塩基対
(B) 型：核酸
(C) 鎖の数：一本鎖
(D) トポロジー：直鎖状
(ii) 配列の種類：他の核酸
(A) 説明：/desc = 「DNA」
(xi) 配列：配列番号15：
TGACAAGCTT ATTCTCTGAA TTCCCCCTTTCT 31

(2) 配列番号16の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 50 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

- (A) 説明: /desc = 「DNA」

(xi) 配列: 配列番号16:

GTCATGCCAT GGCCCTGGTG CCTCGTGGTT CTTGCGGCACTACAAATACT 50

(2) 配列番号17の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 31 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

- (A) 説明: /desc = 「DNA」

(xi) 配列: 配列番号17:

TGACAAGCTT ATTCTCTGAA TTCCCCTTTCT 31

(2) 配列番号18の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 44 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

- (A) 説明: /desc = 「DNA」

(xi) 配列: 配列番号18:

GTCATGCCAT GGCCCTGGTG CCTCGTGGTT GCACTACAAATACT 44

(2) 配列番号19の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 34 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

- (A) 説明: /desc = 「DNA」

(xi) 配列: 配列番号19:

TGACAAGCTT AGCATTCTCT GAATTCCTTTCT 34

(2) 配列番号20の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 19 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類： 他の核酸

(A) 説明： /desc = 「DNA」

(xi) 配列： 配列番号 20:

CAAGTTCAGCCAAGAAAAC

19

(2) 配列番号 21 の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 36 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 他の核酸

(A) 説明: /desc = 「DNA」

(xi) 配列: 配列番号 21:

ACACTTTATT ATCGGAAATC TTCAGCTTCAGGAAAG

36

(2) 配列番号 22 の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 657 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号 22:

TCAGGCACTA CAAATACTGT GGCAGCATAT AATTAACTTGGAATCAAC TAATTTCAAG	60
ACAATTTTGG AGTGGGAACC CAAACCCGTC AATCAAGTCTACACTGTTCA AATAAGCACT	120
AAGTCAGGAG ATTGGAAAAG CAAATGCTTT TACACAACAGACACAGAGTG TGACCTCACC	180
GACGAGATTG TGAAGGATGT GAAGCAGACG TACTTGGCACGGGTCTTCTC CTACCCGGCA	240
GGGAATGTGG AGAGCACCGG TTCTGCTGGG GAGCCTCTGTATGAGAACTC CCCAGAGTTC	300
ACACCTTACC TGGAGACAAA CCTCGGACAG CCAACAATTCAGAGTTTGA ACAGGTGGGA	360
ACAAAAGTGA ATGTGACCGT AGAAGATGAA CGGACTTTAGTCAGAAGGAA CAACACTTTC	420
CTAAGCCTCC GGGATGTTTT TGGCAAGGAC TTAATTTATACACTTTATTA TTGGAAATCT	480
TCAAGTTCAG GAAAGAAAAC AGCCAAAACA AACACTAATGAGTTTTTGAT TGATGTGGAT	540
AAAGGAGAAA ACTACTGTTT CAGTGTTCAG GCAGTGATTCCCTCCCGAAC AGTTAACCGG	600
AAGAGTACAG ACAGCCCGGT AGAGTGTATG GGCCAGGAGAAAGGGGAATT CAGAGAA	657

(2) 配列番号 23 の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 219 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号 23:

Ser Gly Thr ThrAsn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser	
1	15
Thr Asn Phe LysThr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln	
20	30
Val Tyr Thr ValGln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys	
35	45
Cys Phe Tyr ThrThr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val	
50	60

Lys Asp Val LysGln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
 65 70 75 80
 Gly Asn Val GluSer Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
 85 90 95
 Ser Pro Glu PheThr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
 100 105 110
 Ile Gln Ser PheGlu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
 115 120 125
 Asp Glu Arg ThrLeu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
 130 135 140
 Asp Val Phe GlyLys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
 145 150 155 160
 Ser Ser Ser GlyLys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
 165 170 175
 Ile Asp Val AspLys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
 180 185 190
 Ile Pro Ser ArgThr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
 195 200 205
 Cys Met Gly GlnGlu Lys Gly Glu Phe Arg Glu
 210 215

(2) 配列番号 2 4 の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 1947 塩基対
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖の数: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号 2 4:

TGCAGCTGCC TGGCTGCCTG GCCCTGGCTG CCCTGTGTAGCCTTGTGCAC AGCCAGCATG 60
 TGTTCTTGGC TCCTCAGCAA GCACGGTCGC TGCTCCAGCGGGTCCGGCGA GCCAACACCT 120
 TCTTGGAGGA GGTGCGCAAG GGCAACCTAG AGCGAGAGTGGTGGAGGAG ACGTGCAGCT 180
 ACGAGGAGGC CTTCGAGGCT CTGGAGTCCT CCACGGCTACGGATGTGTTC TGGGCCAAGT 240
 ACACAGCTTG TGAGACAGCG AGGACGCCTC GAGATAAGCTTGCTGCATGT CTGGAAGGTA 300
 ACTGTGCTGA GGGTCTGGGT ACGAACTACC GAGGGCATGTGAACATCACC CGGTCAGGCA 360
 TTGAGTGCCA GCTATGGAGG AGTCGCTACC CACATAAGCCTGAAATCAAC TCCACTACCC 420
 ATCCTGGGGC CGACCTACAG GAGAATTTCT GCCGCAACCCGACAGCAGC AACACGGGAC 480
 CCTGGTGCTA CACTACAGAC CCCACCGTGA GGAGGCAGGAATGCAGCATC CCTGTCTGTG 540
 GCCAGGATCA AGTCACTGTA GCGATGACTC CACGCTCCGAAGGCTCCAGT GTGAATCTGT 600
 CACCTCCATT GGAGCAGTGT GTCCCTGATC GGGGGCAGCAGTACCAGGGG CGCCTGGCGG 660
 TGACCACACA TGGGCTCCCC TGCCTGGCCT GGGCCAGCGCACAGGCCAAG GCCCTGAGCA 720
 AGCACCAGGA CTTCAACTCA GCTGTGCAGC TGGTGGAGAACTTCTGCCGC AACCAGACG 780
 GGGATGAGGA GGGCGTGTGG TGCTATGTGG CCGGAAGCCTGGCGACTTT GGGTACTGCG 840
 ACCTCAACTA TTGTGAGGAG GCCGTGGAGG AGGAGACAGGAGATGGGCTG GATGAGGACT 900
 CAGACAGGGC CATCGAAGGG CGTACCGCCA CAAGTGAGTACCAGACTTTC TTCAATCCGA 960
 GGACCTTTGG CTCGGGAGAG GCAGACTGTG GGCTGCGACCTCTGTTCGAG AAGAAGTCGC 1020
 TGGAGGACAA AACCGAAAGA GAGCTCCTGG AATCCTACATCGACGGGCGC ATTGTGGAGG 1080
 GCTCGGATGC AGAGATCGGC ATGTCACCTT GGCAGGTGATGCTTTTCCGG AAGAGTCCCC 1140
 AGGAGCTGCT GTGTGGGGCC AGCCTCATCA GTGACCGCTGGGTCCCTCACC GCCGCCACT 1200
 GCCTCCTGTA CCCGCCCTGG GACAAGAACT TCACCGAGAATGACCTTCTG GTGCGCATTG 1260
 GCAAGCACTC CCGCACCAGG TACGAGCGAA ACATTGAAAAGATATCCATG TTGGAAAAGA 1320

```

TCTACATCCA CCCCAGGTAC AACTGGCGGG AGAACCTGGACCGGGACATT GCCCTGATGA 1380
AGCTGAAGAA GCCTGTTGCC TTCAGTGACT ACATTCACCCTGTGTGTCTG CCCGACAGGG 1440
AGACGGCAGC CAGCTTGCTC CAGGCTGGAT ACAAGGGGCGGGTGACAGGC TGGGGCAACC 1500
TGAAGGAGAC GTGGACAGCC AACGTTGGTA AGGGGAGCCAGTGTCTCTG CAGGTGGTGA 1560
ACCTGCCCCAT TGTGGAGCGG CCGGTCTGCA AGGACTCCACCCGGATCCGC ATCACTGACA 1620
ACATGTTCTG TGCTGGTTAC AAGCCTGATG AAGGGAAACGAGGGGATGCC TGTGAAGGTG 1680
ACAGTGGGGG ACCCTTTGTC ATGAAGAGCC CCTTTAACAACCGCTGGTAT CAAATGGGCA 1740
TCGTCTCATG GGGTGAAGGC TGTGACCGGG ATGGGAAATATGGCTTCTAC ACACATGTGT 1800
TCCGCCTGAA GAAGTGGATA CAGAAGGTCA TTGATCAGTTTGGAGAGTAG GGGGCCACTC 1860
ATATTCTGGG CTCCTGGAAC CAATCCCGTG AAAGAAATATTTTGTGTTT CTAAACTAT 1920
GGTTCCCAAT AAAAGTGACTCTCAGCG 1947

```

(2) 配列番号 25 の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 2462 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号 25:

```

TCAACAGGCA GGGGCAGCAC TGCAGAGATT TCATCATGGTCTCCCAGGCC CTCAGGCTCC 60
TCTGCCTTCT GCTTGGGCTT CAGGGCTGCC TGGCTGCAGGCGGGTCTGCT AAGGCCTCAG 120
GAGGAGAAAC ACGGGACATG CCGTGGAAGC CGGGGCTCACAGAGTCTTC GTAACCCAGG 180
AGGAAGCCCA CGGCGTCCTG CACCGGCGCC GCGCGCCAAACGCGTTCCTG GAGGAGCTGC 240
GGCCGGGCTC CCTGGAGAGG GAGTGCAAGG AGGAGCAGTGCTCCTTCGAG GAGGCCCGGG 300
AGATCTTCAA GGACGCGGAG AGGACGAAGC TGTTCTGGATTCTTACAGT GATGGGGACC 360
AGTGTGCCTC AAGTCCATGC CAGAATGGGG GCTCCTGCAAGGACCAGCTC CAGTCCTATA 420
TCTGCTTCTG CCTCCCTGCC TTCGAGGGCC GGAAGTGTGAGACGCACAAG GATGACCAGC 480
TGATCTGTGT GAACGAGAAC GCGGGCTGTG AGCAGTACTGCAGTGACCAC ACGGGCACCA 540
AGCGCTCCTG TCGGTGCCAC GAGGGGTACT CTCTGCTGGCAGACGGGGTG TCCTGCACAC 600
CCACAGTTGA ATATCCATGT GGAAAAATAC CTATTCTAGAAAAAAGAAAT GCCAGCAAAC 660
CCCAAGGCCG AATTGTGGGG GGCAAGGTGT GCCCCAAGGGGAGTGTCCA TGGCAGGTCC 720
TGTTGTTGGT GAATGGAGCT CAGTTGTGTG GGGGGACCCTGATCAACACC ATCTGGGTGG 780
TCTCCGCGGC CCACTGTTTC GACAAAATCA AGAACTGGAGGAACCTGATC GCGGTGCTGG 840
GCGAGCACGA CCTCAGCGAG CACGACGGGG ATGAGCAGAGCCGGCGGGTG GCGCAGGTCA 900
TCATCCCCAG CACGTACGTC CCGGGCACCA CCAACCACGACATCGCGCTG CTCCGCCTGC 960
ACCAGCCCGT GGTCTCACT GACCATGTGG TGCCCTCTGCCTGCCCGAA CGGACGTTCT 1020
CTGAGAGGAC GCTGGCCTTC GTGCGCTTCT CATTGGTCAGCGGCTGGGGC CAGCTGCTGG 1080
ACCGTGGCGC CACGGCCCTG GAGCTCATGG TGCTCAACGTGCCCCGGCTG ATGACCCAGG 1140
ACTGCCTGCA GCAGTACGG AAGGTGGGAG ACTCCCCAAATATCACGGAG TACATGTTCT 1200
GTGCCGGCTA CTCGGATGGC AGCAAGGACT CCTGCAAGGGGACAGTGGA GGCCACATG 1260
CCACCCACTA CCGGGGCACG TGGTACCTGA CGGGCATCGTCAGCTGGGGC CAGGGCTGCG 1320
CAACCGTGGG CCACTTTGGG GTGTACACCA GGGTCTCCAGTACATCGAG TGGCTGCAAA 1380
AGCTCATGCG CTCAGAGCCA CGCCCAGGAG TCCTCCTGCGAGCCCCATTT CCCTAGCCCA 1440
GCAGCCCTGG CCTGTGGAGA GAAAGCCAAG GCTGCGTCGAACTGTCCTGG CACCAAATCC 1500
CATATATTCT TCTGCAGTTA ATGGGGTAGA GGAGGGCATGGGAGGGAGGG AGAGGTGGGG 1560
AGGGAGACAG AGACAGAAAC AGAGAGAGAC AGAGACAGAGAGAGACTGAG GGAGAGACTC 1620
TGAGGACATG GAGAGAGACT CAAAGAGACT CCAAGATTCAAAGAGACTAA TAGAGACACA 1680
GAGATGGAAT AGAAAAGATG AGAGGCAGAG GCAGACAGGCGCTGGACAGA GGGGCAGGGG 1740
AGTGCCAAGG TTGTCCTGGA GGCAGACAGC CCAGCTGAGCCTCCTTACCT CCCTTCAGCC 1800
AAGCCCCACC TGCACGTGAT CTGCTGGCCC TCAGGCTGCTGCTGCTGCTT CATTGCTGGA 1860

```

GACAGTAGAG	GCATGAACAC	ACATGGATGC	ACACACACACACGCCAATGC	ACACACACAG	1920
AGATATGCAC	ACACACGGAT	GCACACACAG	ATGGTCACACAGAGATACGC	AAACACACCG	1980
ATGCACACGC	ACATAGAGAT	ATGCACACAC	AGATGCACACACAGATATAC	ACATGGATGC	2040
ACGCACATGC	CAATGCACGC	ACACATCAGT	GCACACGGATGCACAGAGAT	ATGCACACAC	2100
CGATGTGCGC	ACACACAGAT	ATGCACACAC	ATGGATGAGCACACACACAC	CAAGTGC GCA	2160
CACACACCGA	TGTACACACA	CAGATGCACA	CACAGATGCACACACACCGA	TGCTGACTCC	2220
ATGTGTGCTG	TCCTCTGAAG	GCGGTTGTTT	AGCTCTCACTTTTCTGGTTC	TTATCCATTA	2280
TCATCTTCAC	TTCAGACAAT	TCAGAAGCAT	CACCATGCATGGTGGCGAAT	GGCCCCAAAC	2340
TCTCCCCAA	ATGTATTTCT	CCCTTCGCTG	GGTGCCGGGCTGCACAGACT	ATTCCCCACC	2400
TGCTTCCCAG	CTTACAATA	AACGGCTGCG	TCTCCTCCGCACACCTGTGG	TGCCTGCCAC	2460
CC					2462

(2) 配列番号 26 の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 1437 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列: 配列番号 26:

ATGCAGCGCG	TGAACATGAT	CATGGCAGAA	TCACCAAGCCTCATCACCAT	CTGCCTTTTA	60
GGATATCTAC	TCAGTGCTGA	ATGTACAGTT	TTTCTTGATCATGAAAACGC	CAACAAAATT	120
CTGAATCGGC	CAAAGAGGTA	TAATTCAGGT	AAATTGGAAGAGTTTGTTCA	AGGGAACCTT	180
GAGAGAGAAT	GTATGGAAGA	AAAGTGTAGT	TTTGAAGAACCACGAGAAGT	TTTTGAAAAC	240
ACTGAAAAGA	CAACTGAATT	TTGGAAGCAG	TATGTTGATGGAGATCAGTG	TGAGTCCAAT	300
CCATGTTTAA	ATGGCGGCAG	TTGCAAGGAT	GACATTAATTCTATGAATG	TTGGTGTCCC	360
TTTGGATTTG	AAGGAAAGAA	CTGTGAATTA	GATGTAACATGTAACATTAA	GAATGGCAGA	420
TGCGAGCAGT	TTTGTAAGAA	TAGTGCTGAT	AACAAGGTGGTTTGCTCCTG	TACTGAGGGA	480
TATCGACTTG	CAGAAAACCA	GAAGTCCTGT	GAACCAGCAGTGCCATTTCC	ATGTGGAAGA	540
GTTTCTGTTT	CACAACTTC	TAAGCTCACC	CGTGCTGAGGCTGTTTTTCC	TGATGTGGAC	600
TATGTAAATC	CTACTGAAGC	TGAAACCATT	TTGGATAACATCACTCAAGG	CACCCAATCA	660
TTTAATGACT	TCACTCGGGT	TGTTGGTGGA	GAAGATGCCAAACCAGGTCA	ATTCCCTTGG	720
CAGGTTGTTT	TGAATGGTAA	AGTTGATGCA	TTCTGTGGAGGCTCTATCGT	TAATGAAAAA	780
TGGATTGTAA	CTGCTGCCCA	CTGTGTTGAA	ACTGGTGTTAAAATTACAGT	TGTCGCAGGT	840
GAACATAATA	TTGAGGAGAC	AGAACATACA	GAGCAAAAGCGAAATGTGAT	TCGAGCAATT	900
ATTCCTCACC	ACAACTACAA	TGCAGCTATT	AATAAGTACAACCATGACAT	TGCCCTTCTG	960
GAAGTGGACG	AACCCTTAGT	GCTAAACAGC	TACGTTACACCTATTTGCAT	TGCTGACAAG	1020
GAATACACGA	ACATCTTCCT	CAAATTTGGA	TCTGGCTATGTAAGTGGCTG	GGCAAGAGTC	1080
TTCCACAAAG	GGAGATCAGC	TTTAGTTCTT	CAGTACCTTAGAGTTCCACT	TGTTGACCGA	1140
GCCACATGTC	TTCGATCTAC	AAAGTTCACC	ATCTATAACAACATGTTCTG	TGCTGGCTTC	1200
CATGAAGGAG	GTAGAGATTC	ATGTCAAGGA	GATAGTGGGGACCCCATGT	TACTGAAGTG	1260
GAAGGGACCA	GTTTCTTAAC	TGGAATTATT	AGCTGGGGTGAAGAGTGTGC	AATGAAAGGC	1320
AAATATGGAA	TATATACCAA	GGTATCCCGG	TATGTCAACTGGATTAAGGA	AAAAACAAAG	1380
CTCACTTAAT	GAAAGATGGA	TTTCCAAGGT	TAATTCATTGGAATTGAAAA	TTAACAG	1437

(2) 配列番号 27 の情報:

(i) 配列の特色:

- (A) 長さ: 1126 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(xi) 配列：配列番号27：

```

GGATTCTGAAG GCAAAACTG TGAATTATTC ACACGGAAGCTCTGCAGCCT GGACAACGGG    60
GACTGTGACC AGTTCTGCCA CGAGGAACAG AACTCTGTGGTGTGCTCCTG CGCCCGCGGG    120
TACACCCTGG CTGACAACGG CAAGGCCTGC ATTCCCACAGGGCCCTACCC CTGTGGGAAA    180
CAGACCCTGG AACGCAGGAA GAGGTCAGTG GCCCAGGCCACCAGCAGCAG CGGGGAGGCC    240
CCTGACAGCA TCACATGGAA GCCATATGAT GCAGCCGACCTGGACCCAC CGAGAACCCC    300
TTCGACCTGC TTGACTTCAA CCAGACGCAG CCTGAGAGGGGCGACAACAA CCTCACCAGG    360
ATCGTGGGAG GCCAGGAATG CAAGGACGGG GAGTGTCCCTGGCAGGCCCT GCTCATCAAT    420
GAGGAAAACG AGGGTTTCTG TGGTGAACCT ATTCTGAGCGAGTTCTACAT CCTAACGGCA    480
GCCCCTGTCT TCTACCAAGC CAAGAGATTC GAAGGGGACCGGAACACGGA GCAGGAGGAG    540
GGCGGTGAGG CGGTGCACGA GGTGGAGGTG GTCATCAAGCACAACCGGTT CACAAAGGAG    600
ACCTATGACT TCGACATCGC CGTGCTCCGG CTCAAGACCCCCATCACCTT CCGCATGAAC    660
GTGGCGCCTG CCTGCCTCCC CGAGCGTGAC TGGGCCGAGTCCACGCTGAT GACGCAGAAG    720
ACGGGGATTG TGAGCGGCTT CGGGCGCACC CACGAGAAGGGCCGGCAGTC CACCAGGCTC    780
AAGATGCTGG AGGTGCCCTA CGTGGACCGC AACAGCTGCAAGCTGTCCAG CAGCTTCATC    840
ATCACCCAGA ACATGTTCTG TGCCGGCTAC GACACCAAGCAGGAGGATGC CTGCCAGGGG    900
GACAGCGGGG GCCCGCACGT CACCCGCTTC AAGGACACCTACTTCGTGAC AGGCATCGTC    960
AGCTGGGGAG AGGGCTGTGC CCGTAAGGGG AAGTACGGGATCTACACCAA GGTCACCGCC   1020
TTCCTCAAGT GGATCGACAG GTCCATGAAA ACCAGGGGCTTGCCCAAGGC CAAGAGCCAT   1080
GCCCCGGAGG TCATAACGTC CTCTCCATTA AAGTGAGATCCCCTC                      1126

```

(2) 配列番号28の情報：

(i) 配列の特色：

- (A) 長さ： 45 塩基対
- (B) 型： 核酸
- (C) 鎖の数： 一本鎖
- (D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 配列の種類： 他の核酸

- (A) 説明： /desc = 「DNA」

(xi) 配列：配列番号28：

```

GAAGAAGGGA TCCTGGTGCC TCGTGGTTCT GGCCTACAAATACT    45

```

(2) 配列番号29の情報：

(i) 配列の特色：

- (A) 長さ： 30 塩基対
- (B) 型： 核酸
- (C) 鎖の数： 一本鎖
- (D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 配列の種類： 他の核酸

- (A) 説明： /desc = 「DNA」

(xi) 配列：配列番号29：

```

CTGGCCTCAA GCTTAACGGAATTCACCTTT    30

```

(2) 配列番号30の情報：

(i) 配列の特色：

- (A) 長さ： 25 アミノ酸
- (B) 型： アミノ酸
- (C) 鎖の数： 一本鎖
- (D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 配列の種類： ペプチド

(xi) 配列：配列番号30：

Ala	Pro	Met	Ala	Glu	Gly	Glu	Gln	Lys	Pro	Arg	Glu	Val	Val	Lys	Phe
1			5					10					15		
Met	Asp	Val	Tyr	Lys	Arg	Ser	Tyr	Cys							
			20					25							

(2) 配列番号31の情報：

(i) 配列の特色：

- (A) 長さ：26 アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列：配列番号31：

Ala	Pro	Met	Ala	Glu	Gly	Gly	Gly	Gln	Asn	His	His	Glu	Val	Val	Lys
1			5					10					15		
Phe	Met	Asp	Val	Tyr	Gln	Arg	Ser	Tyr	Cys						
			20					25							

(2) 配列番号32の情報：

(i) 配列の特色：

- (A) 長さ：25 アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸
 (C) 鎖の数：一本鎖
 (D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列：配列番号32：

Met	Ala	Ala	Gly	Ser	Ile	Thr	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Glu	Gly	Gly
1			5					10					15		
Asp	Gly	Gly	Ala	Phe	Ala	Pro	Gly	Cys							
			20					25							

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、B21-2/10H10二重特異性抗体を介した、tTFのA20細胞への繋ぎ止め（tethering）を示す。A20細胞を様々な濃度のB21-2/10H10（白四角）、SFR8/10H10（黒丸）またはB21-2/OX7（白丸）および過剰量の¹²⁵I-tTFと共に、アジ化ナトリウムの存在下4℃にて1時間インキュベートした。細胞に結合した¹²⁵I-tTFの数を、実施例IIに説明するように決定した。

【図2】図2は、A20細胞当たりの繋ぎ止められたtTF分子の数と、血漿の凝固を誘導する能力との関係を示す。A20細胞を、様々な濃度のB21-2/10H10および過剰量のtTFと共にアジ化ナトリウムの存在下4℃にて1時間インキュベートした。細胞を洗浄し、37℃に加温し、カルシウムおよびマウス血漿を加え、最初のフィブリン鎖が形成されるまでの時間を記録した（横座標）。A20細胞を、二重特異性抗体および¹²⁵I-tTFと共に4℃にて1時間インキュベート

する同一の研究を行って、細胞に特異的に結合したtTFの数を、実施例IIに説明するように決定した（縦座標）。未処理のA20細胞に加えられた血漿（すなわちtTF分子0個/細胞）は、190秒で凝固した。

【図3】図3A、図3B、図3Cおよび図3Dは、コアグ્યリガンド投与後の血管血栓形成および腫瘍壊死の時間経過を示す。直径0.8cmのC1300（Mur）腫瘍を有する3匹のマウスのグループに、14μgのB21-2/10H10および11μgのtTFからなるコアグゅリガンドの静脈内注射をおこなった。図3A；注射前：血管は完全（intact）であり腫瘍細胞は健常である。図3B；0.5時間：腫瘍全体にわたる血管が血栓を有している；腫瘍細胞は健常である。図3C；4時間：全腫瘍血管中に稠密な血栓が存在しており、腫瘍細胞は分離して核凝縮が発生している。腫瘍間隙内に赤血球が見える。図3D；24時間：腫瘍全体にわたって進行した腫瘍壊死。矢印は血管を示す。

【図4】図4は、腫瘍血管系を照準とするコアグゅリガンド治療によって誘導された固形腫瘍の退行を示す。直

径約0.8cmのC1300 (Mur) 腫瘍を有するNu/nuマウスに、tTF (11 μ g) と混合したB21-2/10H10 (14 μ g) の静脈内注射を、1週間間隔で2回おこなった (矢印) (白四角)。コントロールグループのマウスには、tTFのみ (黒丸)、B21-2/10H10のみ (白丸) または希釈液 (黒四角) を同用量与えた。イソ型適合性 (matched) コントロール二重特異性抗体 (SFR8/10H10、OX7/10H10 またはB21-2/OX7) およびtTFを同用量与えた他のコントロールグループのマウスは、tTFのみを与えられた動物におけるものと同様な腫瘍応答を示した。グループ毎のマウスの数は7または8であった。

【図5】図5は、抗体-tTF構築物の例である。この図は、化学的に誘導体化された抗体をジスルフィド結合を介して化学的に誘導体化されたtTFに連結することによって合成された接合体と、様々なTFまたはTF二量体の抗体およびそのフラグメントへの連結によって合成された接合体との両方を示している。

【図6】図6は、A20細胞に結合した際のtTF接合体の血餅形成活性を示す。A20細胞を、様々な濃度の二重特異性B21-2/10H10+H₆ [tTF] を1:1のモル濃度比で1時間予備混合したもの (白四角)、B21-2抗体-H₆C [tTF] (黒丸)、お

よびB21-2抗体-H₆ [tTF] (黒三角) と共にアジ化ナトリウムの存在下4℃にて1時間インキュベートした。細胞を洗浄し、37℃に加温し、カルシウムおよびマウス血漿を加え、最初のフィブリン鎖が形成されるまでの時間を記録した。結果を、tTF不在下の血餅形成時間の%血餅形成時間として表している。

【図7】図7は、抗腫瘍細胞tTF接合体の血餅形成活性を示す。TF9-6B4およびTF8-5G9抗体とプレインキュベートしたLS174細胞 (黒四角)、Widr細胞 (黒丸) およびH460細胞 (黒三角) を、様々な濃度のD612抗体-H₆C [tTF] (黒四角)、KS1/4抗体-H₆ [tTF] (黒丸)、およびXMMCO791抗体-H₆ [tTF] (黒三角) と共にアジ化ナトリウムの存在下4℃にて1時間インキュベートした。細胞を洗浄し、37℃に加温し、カルシウムおよびマウス血漿を加え、最初のフィブリン鎖が形成されるまでの時間を記録した。結果を、tTF不在下の血餅形成時間の%血餅形成時間として表している。

【図8】図8は、第II/IIa因子、第VII/IIa因子、第IX/IXa因子、および第X/Xa因子、のG1aドメイン (γ-カルボキシグルタミン酸) を示す。矢印は、シグナルペプチド切断部位およびペプチド切断部位ならびに活性化切断部位 (斜めの矢印) を表している。

【図1】

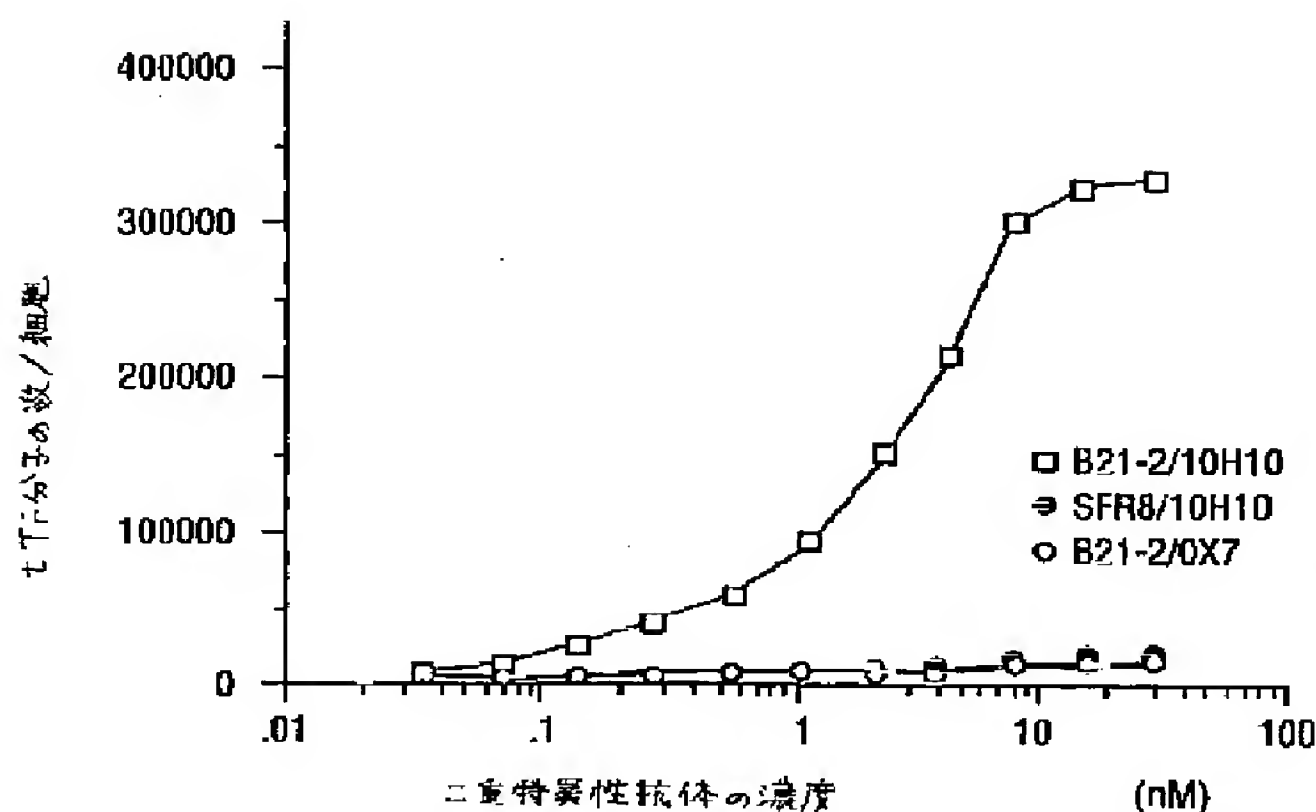


FIG. 1

【図2】

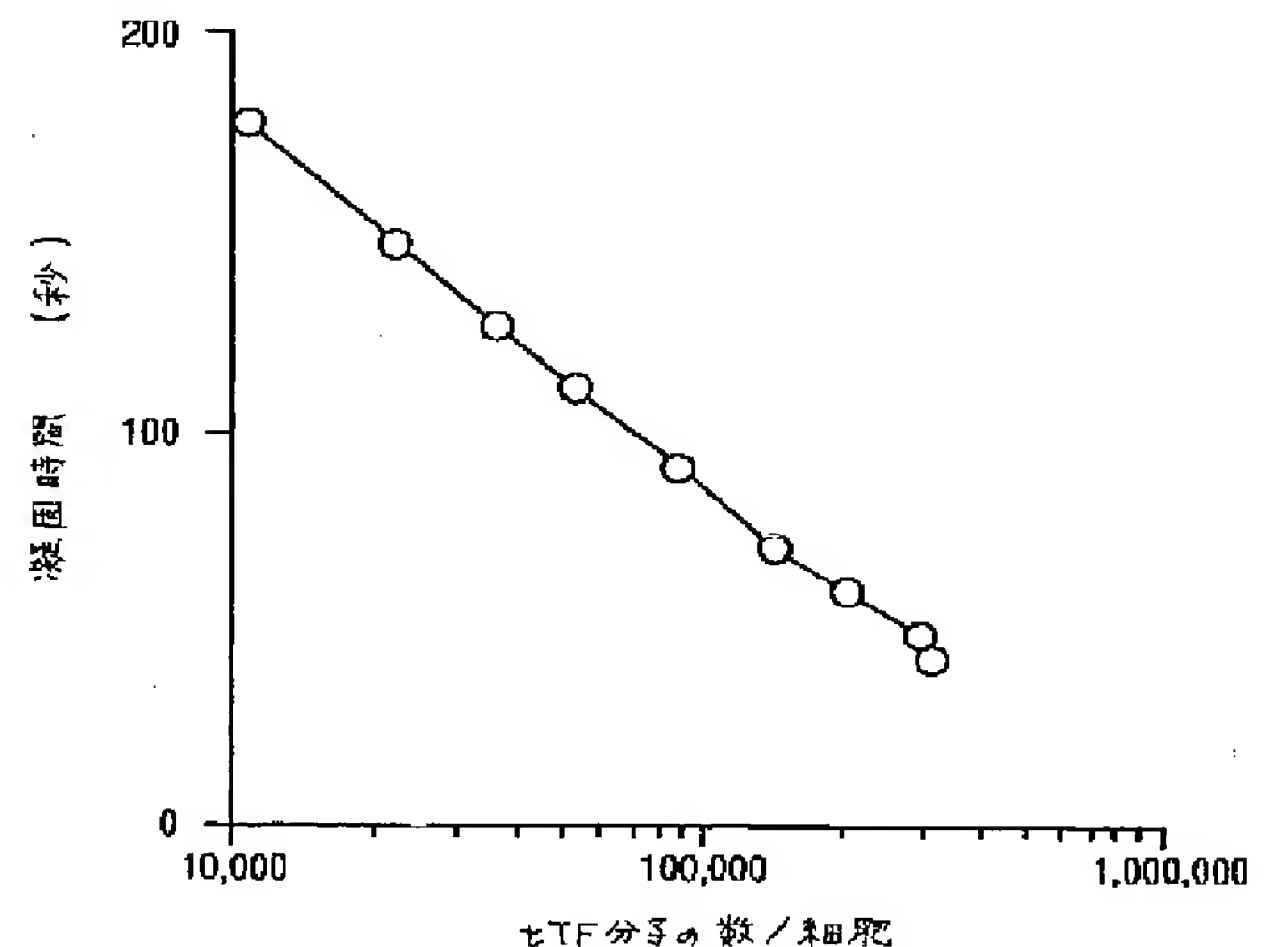
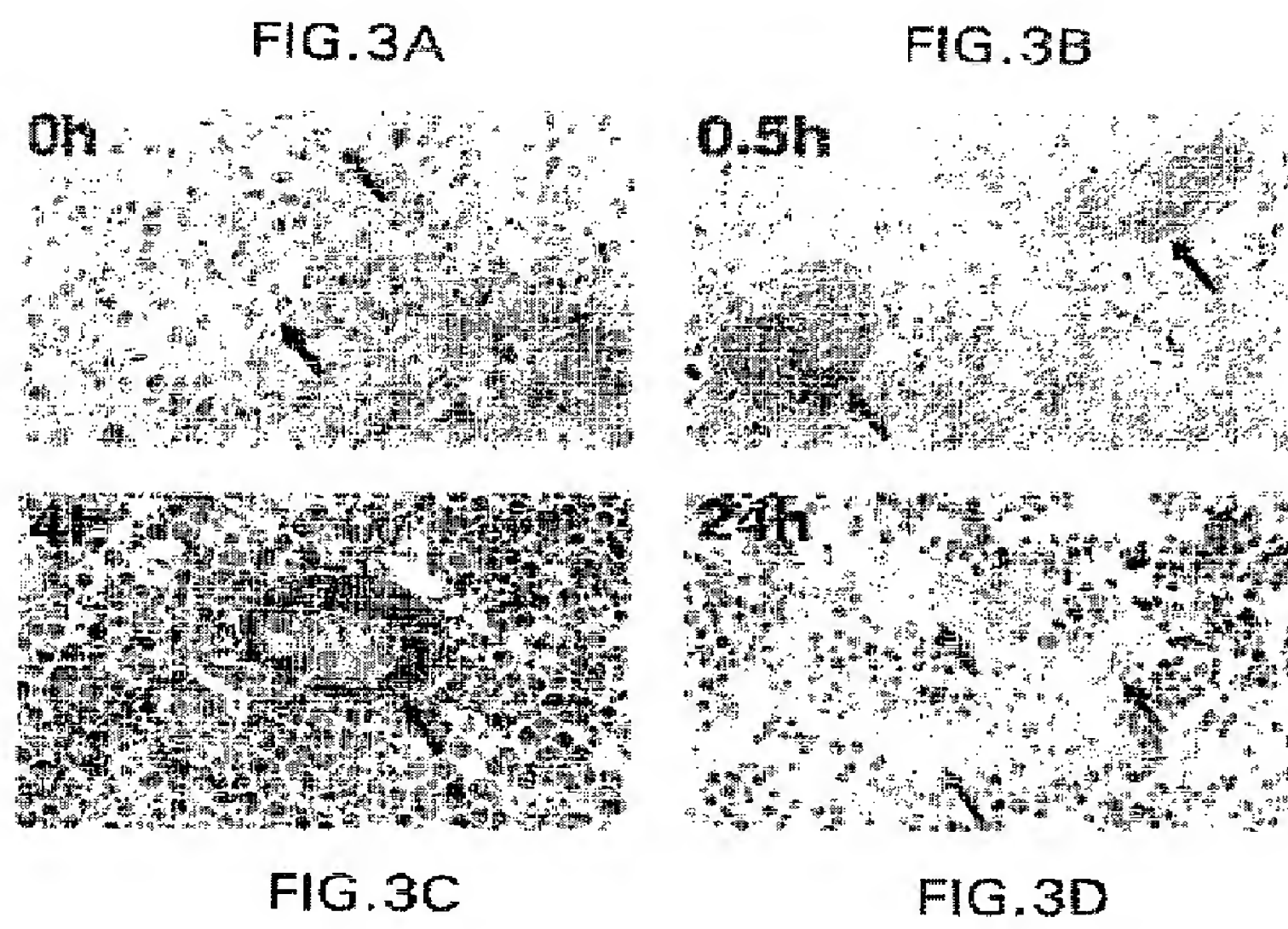


FIG. 2

【図3】



【図4】

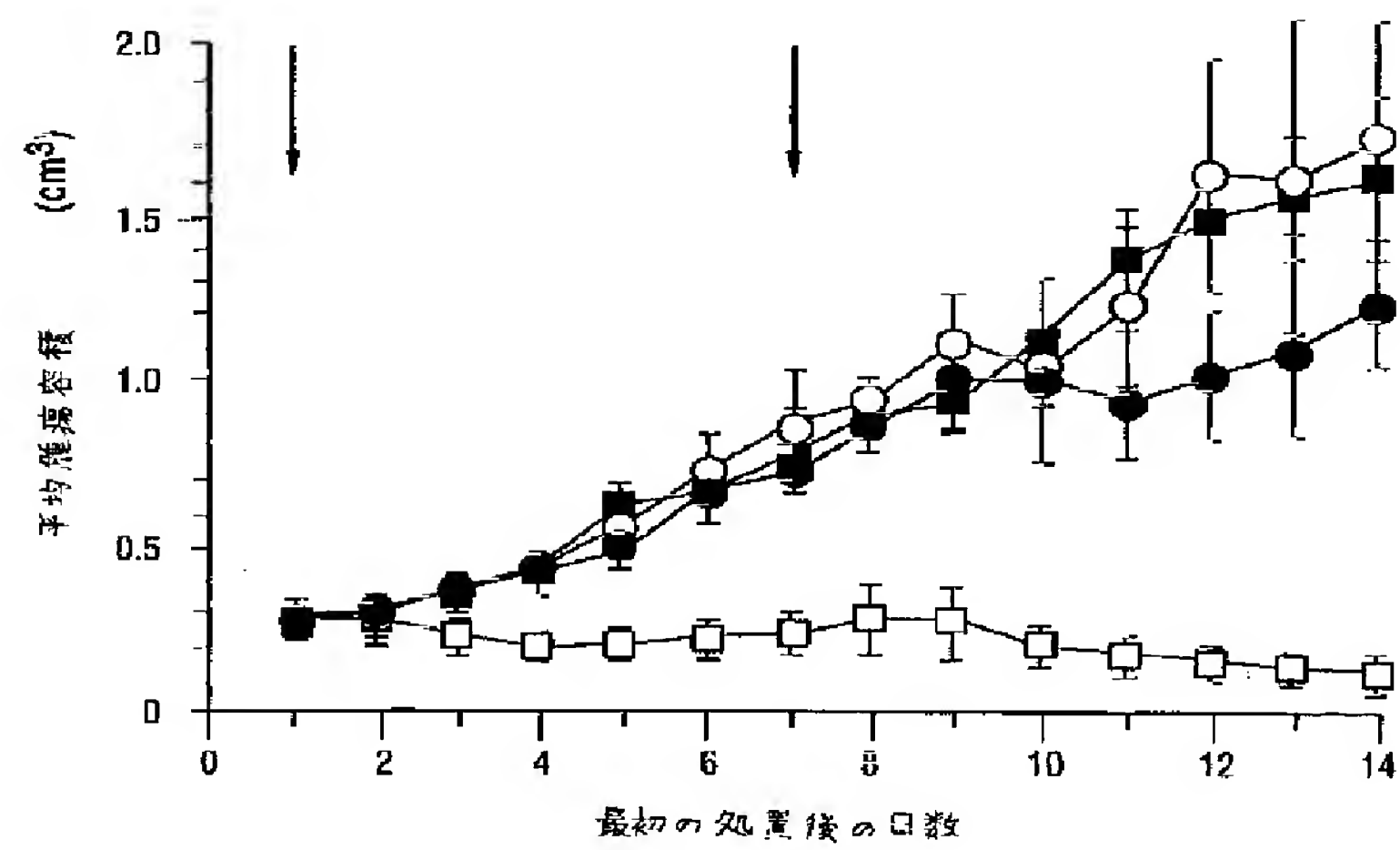


FIG. 4

【図5】

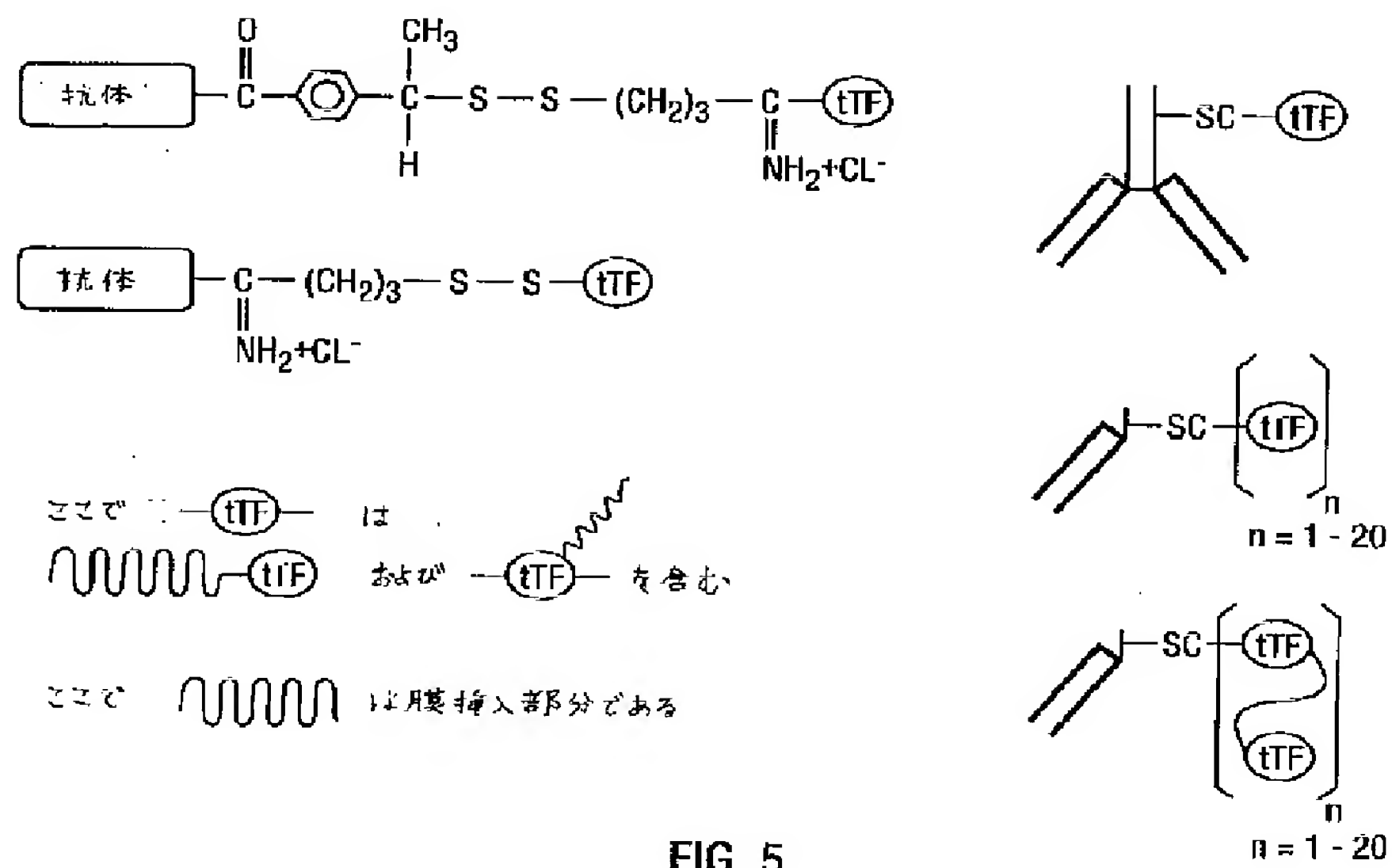


FIG. 5

【図6】

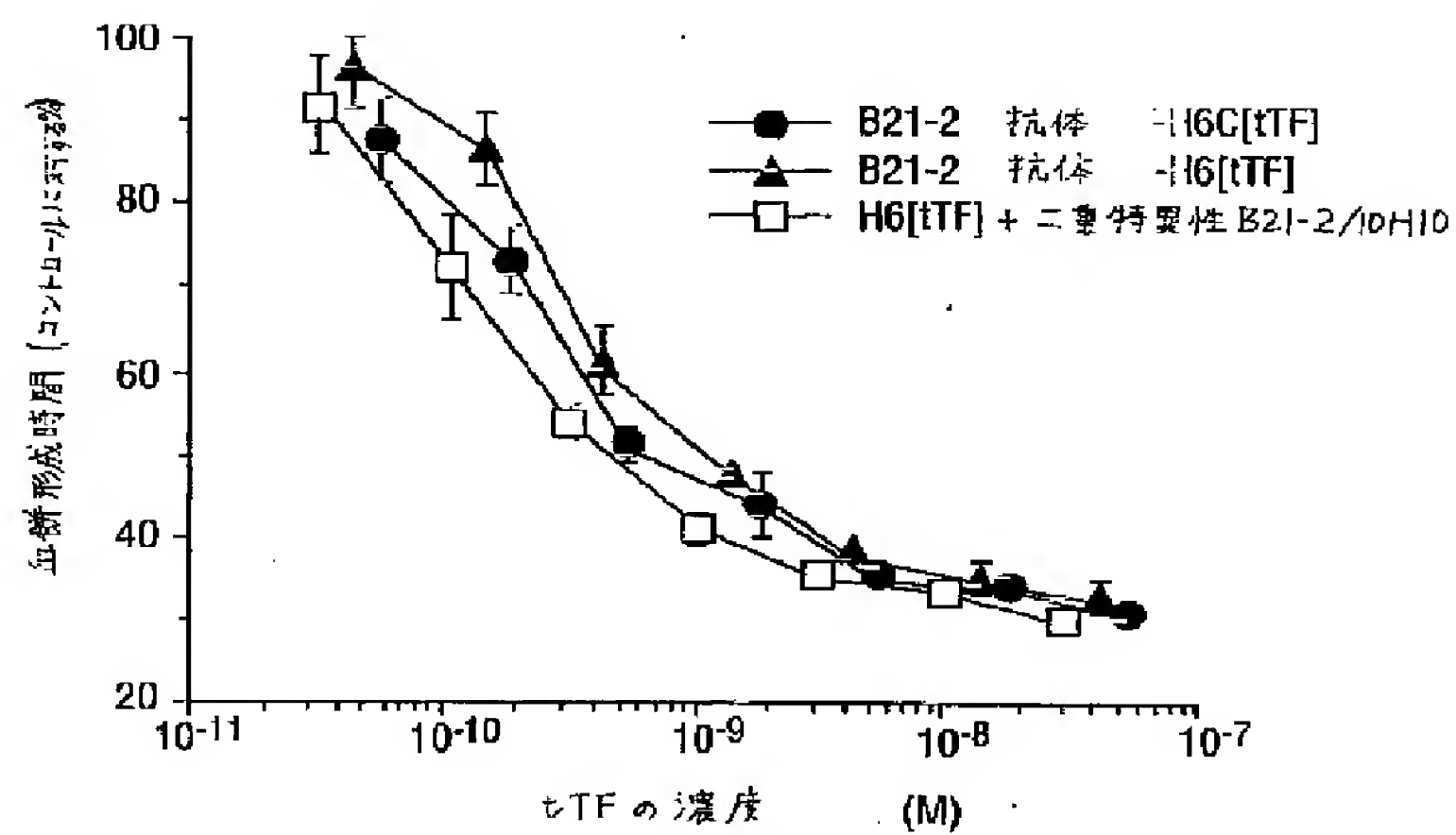


FIG. 6

【図7】

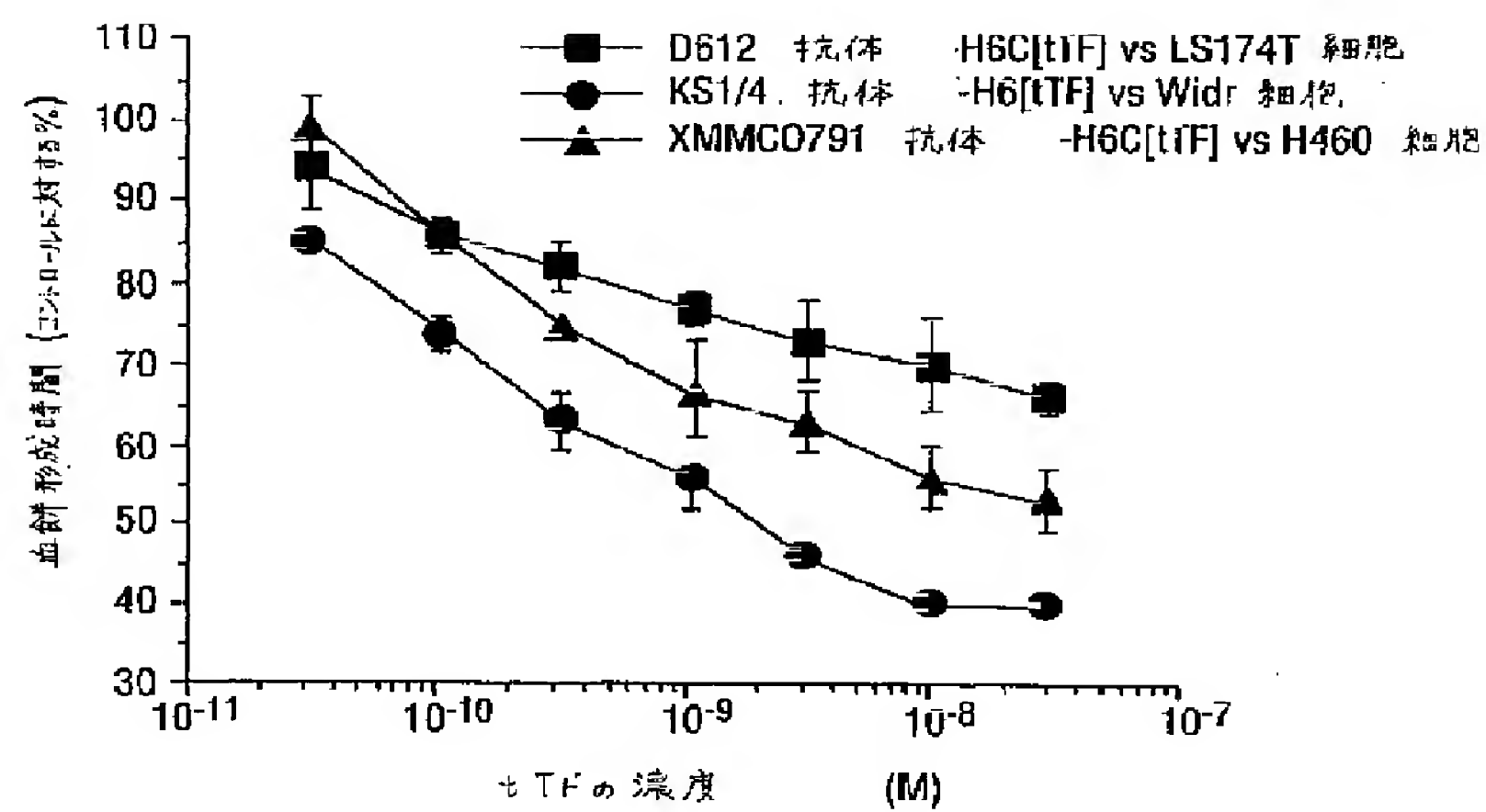


FIG. 7

【図8】

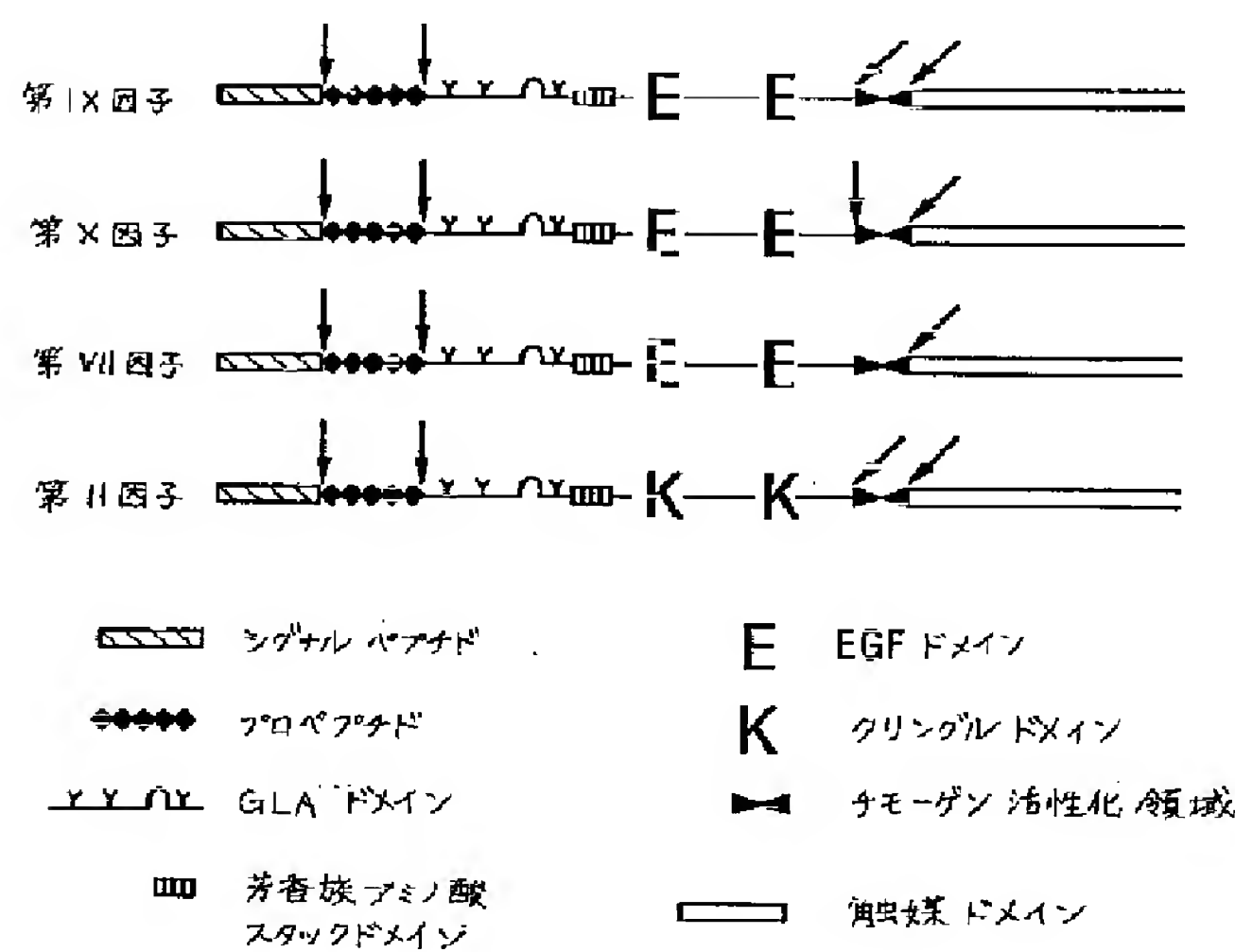


FIG. 8

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	(参考)
A 6 1 P	13/08	A 6 1 P	13/08
	17/06		17/06
	19/02		19/02
	27/02		27/02
	27/06		27/06
	35/00		35/00
C 1 2 N	15/09	C 1 2 N	15/00
			A

(71)出願人 593052785
ザ スクリップス リサーチ インスティ
テュート
アメリカ合衆国 カリフォルニア州
92037 ラ ジョラ ノース トーリー
パインス ロード 10550

(72)発明者 フィリップ イー. トルペ
アメリカ合衆国 テキサス 75214, ダ
ラス, ウエストレイク アベニュー
6918
(72)発明者 トーマス エス. エドギントン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037,
ラ ホヤ, アベニダ デ ラ プラヤ
2362

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : A61K 47/48	A1	(11) International Publication Number: WO 96/01653 (43) International Publication Date: 25 January 1996 (25.01.96)
(21) International Application Number: PCT/US95/07439 (22) International Filing Date: 7 June 1995 (07.06.95) (30) Priority Data: 08/273,567 11 July 1994 (11.07.94) US (60) Parent Application or Grant (63) Related by Continuation US 08/273,567 (CIP) Filed on 11 July 1994 (11.07.94) (71) Applicants (for all designated States except US): BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM [US/US]; 201 West 7th Street, Austin, TX 78701 (US). THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE [US/US]; 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (US). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): THORPE, Philip, E. [GB/US]; 6918 Westlake Avenue, Dallas, TX 75214 (US). EDGINGTON, Thomas, S. [US/US]; 2362 Avenida de la Playa, La Jolla, CA 92037 (US).		(74) Agent: PARKER, David, L.; Arnold, White & Durkee, P.O. Box 4433, Houston, TX 77210 (US). (81) Designated States: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO patent (KE, MW, SD, SZ, UG). Published <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>
(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE SPECIFIC COAGULATION OF VASCULATURE (57) Abstract Disclosed are various compositions and methods for use in achieving specific blood coagulation. This is exemplified by the specific <i>in vivo</i> coagulation of tumor vasculature, causing tumor regression, through the site-specific delivery of a coagulant using a bispecific antibody.		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	GB	United Kingdom	MR	Mauritania
AU	Australia	GE	Georgia	MW	Malawi
BB	Barbados	GN	Guinea	NE	Niger
BE	Belgium	GR	Greece	NL	Netherlands
BF	Burkina Faso	HU	Hungary	NO	Norway
BG	Bulgaria	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BJ	Benin	IT	Italy	PL	Poland
BR	Brazil	JP	Japan	PT	Portugal
BY	Belarus	KE	Kenya	RO	Romania
CA	Canada	KG	Kyrgystan	RU	Russian Federation
CF	Central African Republic	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CG	Congo	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CH	Switzerland	KZ	Kazakhstan	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxembourg	TD	Chad
CS	Czechoslovakia	LV	Latvia	TG	Togo
CZ	Czech Republic	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DE	Germany	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
DK	Denmark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	US	United States of America
FI	Finland	MN	Mongolia	UZ	Uzbekistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

- 1 -

DESCRIPTIONMETHODS AND COMPOSITIONS FOR THE
SPECIFIC COAGULATION OF VASCULATURE

5

BACKGROUND OF THE INVENTION1. Field of the Invention

10

The present invention relates generally to the fields of blood vessels and of coagulation. More particularly, it provides a variety of growth factor-based and immunological reagents, including bispecific antibodies, for use in achieving specific coagulation.

15

2. Description of the Related Art

Advances in the chemotherapy of neoplastic disease have been realized during the last 30 years. This includes some progress in the development of new chemotherapeutic agents and, more particularly, the development of regimens for concurrent administration of drugs. A significant understanding of the neoplastic processes at the cellular and tissue level, and the mechanism of action of basic antineoplastic agents, has also allowed advances in the chemotherapy of a number of neoplastic diseases, including choriocarcinoma, Wilm's tumor, acute leukemia, rhabdomyosarcoma, retinoblastoma, Hodgkin's disease and Burkitt's lymphoma. Despite the advances that have been made in a few tumors, though, many of the most prevalent forms of human cancer still resist effective chemotherapeutic intervention.

20

25

30

35

A significant underlying problem that must be addressed in any treatment regimen is the concept of "total cell kill." This concept holds that in order to

- 2 -

have an effective treatment regimen, whether it be a surgical or chemotherapeutic approach or both, there must be a total cell kill of all so-called "clonogenic" malignant cells, that is, cells that have the ability to grow uncontrolled and replace any tumor mass that might be removed. Due to the ultimate need to develop therapeutic agents and regimens that will achieve a total cell kill, certain types of tumors have been more amenable than others to therapy. For example, the soft tissue tumors (e.g., lymphomas), and tumors of the blood and blood-forming organs (e.g., leukemias) have generally been more responsive to chemotherapeutic therapy than have solid tumors such as carcinomas.

One reason for the susceptibility of soft and blood-based tumors to chemotherapy is the greater physical accessibility of lymphoma and leukemic cells to chemotherapeutic intervention. Simply put, it is much more difficult for most chemotherapeutic agents to reach all of the cells of a solid tumor mass than it is the soft tumors and blood-based tumors, and therefore much more difficult to achieve a total cell kill. Increasing the dose of chemotherapeutic agents most often results in toxic side effects, which generally limits the effectiveness of conventional anti-tumor agents.

The strategy to develop successful antitumor agents involves the design of agents that will selectively kill tumor cells, while exerting relatively little, if any, untoward effects against normal tissues. This goal has been elusive to achieve, though, in that there are few qualitative differences between neoplastic and normal tissues. Because of this, much research over the years has focused on identifying tumor-specific "marker antigens" that can serve as immunological targets both for chemotherapy and diagnosis. Many tumor-specific, or quasi-tumor-specific ("tumor-associated"), markers have

- 3 -

been identified as tumor cell antigens that can be recognized by specific antibodies. Unfortunately, it is generally the case that tumor specific antibodies will not in and of themselves exert sufficient antitumor effects to make them useful in cancer therapy.

More recently, immunotoxins have been employed in an attempt to selectively target cancer cells. Immunotoxins are conjugates of a specific targeting agent, typically a tumor-directed antibody or fragment, with a cytotoxic agent, such as a toxin moiety. The targeting agent is designed to direct the toxin to cells carrying the targeted antigen and to kill such cells. "Second generation" immunotoxins have now been developed, for example, those that employ deglycosylated ricin A chain to prevent entrapment of the immunotoxin by the liver and reduce hepatotoxicity (Blakey et al., 1987a;b), and those with new crosslinkers to endow the immunotoxins with higher in vivo stability (Thorpe et al., 1988).

Immunotoxins have proven effective at treating lymphomas and leukemias in mice (Thorpe et al., 1988; Ghetie et al., 1991; Griffin et al., 1988a;b) and in man (Vitetta et al., 1991). However, lymphoid neoplasias are particularly amenable to immunotoxin therapy because the tumor cells are relatively accessible to blood-borne immunotoxins. Also, it is possible to target normal lymphoid antigens because the normal lymphocytes, which are killed along with the malignant cells during therapy, are rapidly regenerated from progenitors lacking the target antigens.

In contrast with their efficacy in lymphomas, immunotoxins have proved relatively ineffective in the treatment of solid tumors (Weiner et al., 1989; Byers et al., 1989). The principal reason for this is that solid tumors are generally impermeable to antibody-sized

- 4 -

molecules: specific uptake values of less than 0.001% of the injected dose/g of tumor are not uncommon in human studies (Sands et al., 1988; Epenetos et al., 1986). Another significant problem is that antigen-deficient
5 mutants can escape being killed by the immunotoxin and regrow (Thorpe et al., 1988).

Furthermore, antibodies that enter the tumor mass do not distribute evenly for several reasons. Firstly, the
10 dense packing of tumor cells and fibrous tumor stromas present a formidable physical barrier to macromolecular transport and, combined with the absence of lymphatic drainage, create an elevated interstitial pressure in the tumor core which reduces extravasation and fluid
15 convection (Baxter et al., 1991; Jain, 1990). Secondly, the distribution of blood vessels in most tumors is disorganized and heterogeneous, so some tumor cells are separated from extravasating antibody by large diffusion distances (Jain, 1990). Thirdly, all of the antibody
20 entering the tumor may become adsorbed in perivascular regions by the first tumor cells encountered, leaving none to reach tumor cells at more distant sites (Baxter et al., 1991; Kennel et al., 1991).

25 Thus, it is quite clear that a significant need exists for the development of novel strategies for the treatment of solid tumors. One approach involves the targeting of agents to the vasculature of the tumor, rather than to tumor cells. Solid tumor growth is highly
30 dependent on the vascularization of the tumor and the growth of tumor cells can only be maintained if the supply of oxygen, nutrients and other growth factors and the efflux of metabolic products are satisfactory. Indeed, it has been observed that many existing therapies
35 may already have, as part of their action, a vascular-mediated mechanism of action (Denekamp, 1990).

- 5 -

The present inventors propose that targeting the vasculature will likely deprive the tumor of life sustaining events and result in reduced tumor growth rate or tumor cell death. This approach is contemplated to offer several advantages over direct targeting of tumor cells. Firstly, the target cells are directly accessible to intravenously administered therapeutic agents, permitting rapid localization of a high percentage of the injected dose (Kennel et al., 1991). Secondly, since each capillary provides oxygen and nutrients for thousands of cells in its surrounding 'cord' of tumor, even limited damage to the tumor vasculature could produce an avalanche of tumor cell death (Denekamp, 1990; Denekamp, 1984). Finally, the outgrowth of mutant endothelial cells, lacking a target antigen, is unlikely because they are normal cells.

At the present time, it is generally accepted that for tumor vascular targeting to succeed, antibodies are required that recognize tumor endothelial cells but not those in normal tissues. Although several antibodies have been raised (Duijvestijn et al., 1987; Hagemeier et al., 1986; Bruland et al., 1986; Murray et al., 1989; Schlingemann et al., 1985), none have shown a high degree of specificity. Also, there do not appear to be reports of any particular agents, other than the aforementioned toxins, that show promise as the second agent in a vascular targeted antibody conjugate. Thus, unfortunately, while vascular targeting presents certain theoretical advantages, effective strategies incorporating these advantages have yet to be developed.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention overcomes the limitations of the prior art by providing novel compositions and methods

- 6 -

for use in achieving specific coagulation, for example, coagulation in tumor vasculature, with limiting side-effects. The invention, in a general and overall sense, concerns various novel immunological and growth factor-based bispecific compositions capable of stimulating coagulation in disease-associated vasculature, and methods for their preparation and use.

The invention provides binding ligands that may generally be described as "bispecific binding ligands". Such ligands comprise a "first binding region" that typically binds to a disease-related target cell, such as a tumor cell, or to a component associated with such a cell; to some component associated with disease-related vasculature, e.g., tumor vasculature; or to a component of, or associated with, disease-associated stroma. The first binding region is operatively associated with or linked to a "coagulating agent", which may be either a coagulation factor itself or may be a second binding region that is capable of binding to a coagulation factor.

The binding ligands of the invention are described as "bispecific" as they are "at least" bispecific, i.e., they comprise, at a minimum, two functionally distinct regions. Compositions and methods using other constructs, such as trispecific and mutlispecific binding ligands, are also included within the scope of the invention. Combined compositions, kits and methods of using the bispecific coagulating ligands described herein in conjunction with other effectors, such as other immunological- and growth-factor-based compositions, antigen-inducing agents, immunostimulants, immunosuppressants, chemotherapeutic drugs, and the like, are also contemplated.

- 7 -

The first binding regions, and any second binding regions, may be antibodies or fragments thereof. As used herein, the term "antibody" is intended to refer broadly to any immunologic binding agent such as IgG, IgM, IgA, IgD and IgE. Generally, IgG or IgM are preferred because they are the most common antibodies in the physiological situation and because they are most easily made in a laboratory setting. Monoclonal antibodies (MAbs) are recognized to have certain advantages, e.g., reproducibility and large-scale production, and their use is generally preferred. Engineered antibodies, such as recombinant antibodies and humanized antibodies, also fall within the scope of the invention.

Where antigen binding regions of antibodies are employed as the binding and targeting agent, a complete antibody molecule may be employed. Alternatively, a functional antigen binding region may be used, as exemplified by Fv, scFv (single chain Fv), Fab', Fab, Dab or F(ab')₂ fragment of an antibody. The techniques for preparing and using various antibody-based constructs are well known in the art and are further described herein.

The coagulation factor portion of the binding ligands is formed so that it maintains significant functional capacity, i.e., it is in a form so that, when delivered to the target region, it still retains its ability to promote blood coagulation or clotting. However, in certain embodiments, the coagulation factor portion of the binding ligands will be less active than, for example, the natural counterpart of the coagulant, and the factor will achieve the desired level of activity only upon delivery to the target area. One such example is a vitamin K-dependent coagulation factor that lacks the Gla modification, which will nonetheless achieve significant functional activity upon binding of the first

- 8 -

binding region of the bispecific ligand to a membrane environment.

Where a second binding region is used to bind a
5 coagulation factor, it is generally chosen so that it
recognizes a site on the coagulation factor that does not
significantly impair its ability to induce coagulation.
Likewise, where a coagulation factor is covalently linked
to a first binding agent, a site distinct from its
10 functional coagulating site is generally used to join the
molecules.

The "first binding region" of the bispecific ligands
of the invention may be any component that binds to a
15 designated target site, i.e., a site associated with a
tumor region or other disease site in which coagulation
is desired. The target molecule, in the case of tumor
targeting, will generally be present at a higher
concentration in the tumor site than in non-tumor sites.
20 In certain preferred embodiments, the targeted molecules,
whether associated with tumor cells, tumor vascular
cells, tumor-associated stroma, or other components, will
be restricted to such cells or other tumor-associated
entities, however, this is not a requirement of the
25 invention.

In this regard, it should be noted that tumor
vasculature is 'prothrombotic' and is predisposed towards
coagulation. It is thus contemplated that a targeted
30 coagulant is likely to preferentially coagulate tumor
vasculature while not coagulating normal tissue
vasculature, even if other normal cells or body
components, particularly, the normal endothelial cells or
even stroma, express significant levels of the target
35 molecule. This approach is therefore envisioned to be
safer for use in humans, e.g., as a means of treating

- 9 -

cancer, than that of targeting a toxin to tumor vasculature.

5 In certain embodiments, the first binding regions contemplated for use in this invention may be directed to a tumor cell component or to a component associated with a tumor cell. In targeting generally to a tumor cell, it is believed that the first binding ligand will cause the coagulation factor component of the bispecific binding
10 ligand to concentrate on those perivascular tumor cells nearest to the blood vessel and thus trigger coagulation of tumor blood vessels, giving the bispecific binding ligand significant utility.

15 A first binding region may therefore be a component, such as an antibody or other agent, that binds to a tumor cell. Agents that "bind to a tumor cell" are defined herein as ligands that bind to any accessible component or components of a tumor cell, or that bind to a
20 component that is itself bound to, or otherwise associated with, a tumor cell, as further described herein.

The majority of such tumor-binding ligands are
25 contemplated to be agents, particularly antibodies, that bind to a cell surface tumor antigen or marker. Many such antigens are known, as are a variety of antibodies for use in antigen binding and tumor targeting. The invention thus includes first binding regions, such as
30 antigen binding regions of antibodies, that bind to an identified tumor cell surface antigen, such as those listed in Table I, and first binding regions that preferentially or specifically bind to an intact tumor cell, such as binding to a tumor cell listed in Table II.

35

Currently preferred examples of tumor cell binding regions are those that comprise an antigen binding region

- 10 -

of an antibody that binds to the cell surface tumor antigen p185^{HER2}, milk mucin core protein, TAG-72, Lewis a or carcinoembryonic antigen (CEA). Another group of currently preferred tumor cell binding regions are those that comprise an antigen binding region of an antibody that binds to a tumor-associated antigen that binds to the antibody 9.2.27, OV-TL3, MOv18, B3, KS1/4, 260F9 or D612.

10 The antibody 9.2.27 binds to high M_r melanoma antigens, OV-TL3 and MOv18 both bind to ovarian-associated antigens, B3 and KS1/4 bind to carcinoma antigens, 260F9 binds to breast carcinoma and D612 binds to colorectal carcinoma. Antigen binding moieties that bind to the same antigen as D612, B3 or KS1/4 are particularly preferred. D612 is described in U.S. Patent 5,183,756, and has ATCC Accession No. HB 9796; B3 is described in U.S. Patent 5,242,813, and has ATCC Accession No. HB 10573; and recombinant and chimeric KS1/4 antibodies are described in U.S. Patent 4,975,369; each incorporated herein by reference.

25 In tumor cell targeting, where the tumor marker is a component, such as a receptor, for which a biological ligand has been identified, the ligand itself may also be employed as the targeting agent, rather than an antibody. Active fragments or binding regions of such ligands may also be employed.

30 First binding regions for use in the invention may also be components that bind to a ligand that is associated with a tumor cell marker. For example, where the tumor antigen in question is a cell-surface receptor, tumor cells *in vivo* will have the corresponding biological ligand, e.g., hormone, cytokine or growth factor, bound to their surface and available as a target. This includes both circulating ligands and "paracrine-

- 11 -

type" ligands that may be generated by the tumor cell and then bound to the cell surface.

5 The present invention thus further includes first
binding regions, such as antibodies and fragments
thereof, that bind to a ligand that binds to an
identified tumor cell surface antigen, such as those
listed in Table I, or that preferentially or specifically
binds to one or more intact tumor cells. Additionally,
10 the receptor itself, or preferably an engineered or
otherwise soluble form of the receptor or receptor
binding domain, could also be employed as the binding
region of a bispecific coagulating ligand.

15 In further embodiments, the first binding region may
be a component that binds to a target molecule that is
specifically or preferentially expressed in a disease
site other than a tumor site. Exemplary target molecules
associated with other diseased cells include, for
20 example, PSA associated with Benign Prostatic Hyperplasia
(BPH) and FGF associated with proliferative diabetic
retinopathy. It is believed that an animal or patient
having one of the above diseases would benefit from the
specific induction of coagulation in the disease site.

25 This is the meaning of "diseased cell" in the
present context, i.e., it is a cell that is connected
with a disease or disorder, which cell expresses, or is
otherwise associated with, a targetable component that is
30 present at a higher concentration in the disease sites
and cells in comparison to its levels in non-diseased
sites and cells. This includes targetable components
that are associated with the vasculature in the disease
sites.

35 Exemplary first binding regions for use in targeting
and delivering a coagulant to other disease sites include

- 12 -

antibodies, such as anti-PSA (BPH), and GF82, GF67 3H3, that bind to FGF. Biological binding ligands, such as FGF, that bind to the relevant receptor, in this case the FGF receptor, may also be used. Antibodies against
5 vascular targets may also be employed, as described below. The targeting of the stroma or endothelial cells provides a powerful means of treating other diseases where the "diseased cell" itself may not be associated with a strong or unique marker antigen.

10

In further embodiments, the first binding regions of the invention will be components that are capable of binding to a component of disease-associated vasculature, i.e., a region of vasculature in which specific
15 coagulation would be advantageous to the animal or patient. First binding regions capable of binding to a component specifically or preferentially associated with tumor vasculature are currently preferred. "Components of tumor vasculature" include both tumor vasculature
20 endothelial cell surface molecules and any components, such as growth factors, that may be bound to these cell surface receptors or molecules.

Certain preferred binding ligands are antibodies,
25 and fragments thereof, that bind to cell surface receptors and antibodies that bind to the corresponding biological ligands of these receptors. Exemplary antibodies are those that bind to MHC Class II proteins, VEGF/VPF receptors, FGF receptors, TGF β receptors, a TIE
30 (tyrosine kinase-immunoglobulin-epidermal growth factor-like receptor, including TIE-1 and TIE-2), VCAM-1, P-selectin, E-selectin, $\alpha_v\beta_3$ integrin, pleiotropin, endosialin and endoglin.

35 First binding regions that comprise an antigen binding region of an antibody that binds to endoglin are one group of preferred agents. These are exemplified by

- 13 -

antibodies and fragments that bind to the same epitope as the monoclonal antibody TEC-4 or the monoclonal antibody TEC-11.

5 Antigen binding region of antibodies that bind to the VEGF receptor are another group of preferred agents. These are particularly exemplified by antibodies and fragments that bind to the same epitope as the monoclonal antibody 3E11, 3E7, 5G6, 4D8, 10B10 or TEC-110. Anti-
10 VEGF antibodies with binding specificities substantially the same as any one of the antibodies termed 1B4, 4B7, 1B8, 2C9, 7D9, 12D2, 12D7, 12E10, 5E5, 8E5, 5E11, 7E11, 3F5, 10F3, 1F4, 2F8, 2F9, 2F10, 1G6, 1G11, 3G9, 9G11, 10G9, GV97, GV39, GV97 γ , GV39 γ , GV59 or GV14 may also be
15 used. Further suitable anti-VEGF antibodies include 4.6.1., A3.13.1, A4.3.1 and B2.6.2 (Kim et. al., 1992); SBS94.1 (Oncogene Science); G143-264 and G143-856 (Pharmingen).

20 Further useful antibodies are those that bind to a ligand that binds to a tumor vasculature cell surface receptor. Antibodies that bind to VEGF/VPF, FGF, TGF β , a ligand that binds to a TIE, a tumor-associated fibronectin isoform, scatter factor, hepatocyte growth
25 factor (HGF), platelet factor 4 (PF4), PDGF (including PDGFa and PDGFb) and TIMP (a tissue inhibitor of metalloproteinases, including TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3) are therefore useful in these embodiments, with
30 antibodies that bind to VEGF/VPF, FGF, TGF β , a ligand that binds to a TIE or a tumor-associated fibronectin isoform often being preferred.

 In still further embodiments, it is contemplated that markers specific for tumor vasculature may be those
35 that have been first induced, i.e., their expression specifically manipulated by the hand of man, allowing

- 14 -

subsequent targeting using a binding ligand, such as an antibody.

Exemplary inducible antigens include those inducible
5 by a cytokine, e.g., IL-1, IL-4, TNF- α , TNF- β or IFN- γ ,
as may be released by monocytes, macrophages, mast cells,
helper T cells, CD8-positive T-cells, NK cells or even
tumor cells. Examples of the induced targets are
E-selectin, VCAM-1, ICAM-1, endoglin and MHC Class II
10 antigens. When using MHC Class II induction, the
suppression of MHC Class II in normal tissues is
generally required, as may be achieved using a
cyclosporin, such as Cyclosporin A (CsA), or a
functionally equivalent agent.

15

Further inducible antigens include those inducible
by a coagulant, such as by thrombin, Factor IX/IXa,
Factor X/Xa, plasmin or a metalloproteinase (matrix
metalloproteinase, MMP). Generally, antigens inducible
20 by thrombin will be used. This group of antigens
includes P-selectin, E-selectin, PDGF and ICAM-1, with
the induction and targeting of P-selectin and/or
E-selectin being generally preferred.

25 Antibodies that bind to epitopes that are present on
ligand-receptor complexes, but absent from both the
individual ligand and receptor may also be used. Such
antibodies will recognize and bind to a ligand-receptor
complex, as presented at the cell surface, but will not
30 bind to the free ligand or uncomplexed receptor. A
"ligand-receptor complex", as used herein, therefore
refers to the resultant complex produced when a ligand,
such as a growth factor, specifically binds to its
receptor, such as a growth factor receptor. This is
35 exemplified by the VEGF/VEGF receptor complex.

- 15 -

It is envisioned that such ligand-receptor complexes will likely be present in a significantly higher number on tumor-associated endothelial cells than on non-tumor associated endothelial cells, and may thus be targeted by anti-complex antibodies. Anti-complex antibodies include those antibodies and fragments thereof that bind to the same epitope as the monoclonal antibody 2E5, 3E5 or 4E5.

In further embodiments, the first binding regions contemplated for use in this invention will bind to a component of disease-associated stroma, such as a component of tumor-associated stroma. This includes antigen binding regions of antibodies that bind to basement membrane components, activated platelets and inducible tumor stroma components, especially those inducible by a coagulant, such as thrombin. "Activated platelets" are herein defined as a component of tumor stroma, one reason for which being that they bind to the stroma when activated.

Preferred targetable elements of tumor-associated stroma are currently the tumor-associated fibronectin isoforms. Fibronectin isoforms are ligands that bind to the integrin family of receptors. Tumor-associated fibronectin isoforms are available, e.g., as recognized by the MAb BC-1. This Mab, and others of similar specificity, are therefore preferred agents for use in the present invention. Fibronectin isoforms, although stromal components, bind to endothelial cells and may thus be considered as a targetable vascular endothelial cell-bound ligand in the context of the invention.

Another group of preferred anti-stromal antibodies are those that bind to RIBS, the receptor-induced binding site, on fibrinogen. RIBS is a targetable antigen, the expression of which in stroma is dictated by activated platelets. Antibodies that bind to LIBS, the ligand-

- 16 -

induced binding site, on activated platelets are also useful.

One further group of useful antibodies are those
5 that bind to tenascin, a large molecular weight
extracellular glycoprotein expressed in the stroma of
various benign and malignant tumors. Antibodies such as
those described by Shrestha et. al. (1994) and 143DB7C8,
described by Tuominen & Kallioinen (1994), may thus be
10 used as the binding portions of the coaguligands.

"Components of disease- and tumor-associated stroma"
include various cell types, matrix components, effectors
and other molecules components that may be considered, by
15 some, to be outside the narrowest definition of "stroma",
but are nevertheless targetable entities that are
preferentially associated with a disease region, such as
a tumor.

20 Accordingly, the first binding region may be an
antibody or ligand that binds to a smooth muscle cell, a
pericyte, a fibroblast, a macrophage, an infiltrating
lymphocyte or leucocyte. First binding regions may also
bind to components of the connective tissue, and include
25 antibodies and ligands that bind to, e.g., fibrin,
proteoglycans, glycoproteins, collagens, and anionic
polysaccharides such as heparin and heparin-like
compounds.

30 In other preferred embodiments, the vasculature and
stroma binding ligands of the invention will be binding
regions that are themselves biological ligands, or
portions thereof, rather than an antibodies. "Biological
ligands" in this sense will be those molecules that bind
35 to or associate with cell surface molecules, such as
receptors, that are accessible in the stroma or on
vascular cells; as exemplified by cytokines, hormones,

- 17 -

growth factors, and the like. Any such growth factor or ligand may be used so long as it binds to the disease-associated stroma or vasculature, e.g., to a specific biological receptor present on the surface of a tumor vasculature endothelial cell.

Suitable growth factors for use in these aspects of the invention include, for example, VEGF/VPF (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor), FGF (the fibroblast growth factor family of proteins), TGF β (transforming growth factor B), a ligand that binds to a TIE, a tumor-associated fibronectin isoform, scatter factor, hepatocyte growth factor (HGF), platelet factor 4 (PF4), PDGF (platelet derived growth factor), TIMP or even IL-8, IL-6 or Factor XIIIa. VEGF/VPF and FGF will often be preferred.

Targeting an endothelial cell-bound component, e.g., a cytokine or growth factor, with a binding ligand construct based on a known receptor is also contemplated. Generally, where a receptor is used as a targeting component, a truncated or soluble form of the receptor will be employed. In such embodiments, it is particularly preferred that the targeted endothelial cell-bound component be a dimeric ligand, such as VEGF. This is preferred as one component of the dimer will already be bound to the cell surface receptor *in situ*, leaving the other component of the dimer available for binding the soluble receptor portion of the bispecific coagulating ligand.

The use of bispecific, or tri- or multi-specific, ligands that include at least one targeting region capable of binding to a component of disease-associated vasculature has the advantage that vascular endothelial cells, and disease-associated agents such as activated platelets, are similar in different diseases, and

- 18 -

particularly in different tumors. This phenomenon makes it feasible to treat numerous diseases and types of cancer with one pharmaceutical, rather than having to tailor the agent to each individual disease or specific
5 tumor type.

The compositions and methods of the present invention are thus suitable for use in treating both benign and malignant diseases that have a vascular
10 component. Such vasculature-associated diseases include benign growths, such as BPH, diabetic retinopathy, vascular restenosis, arteriovenous malformations (AVM), meningioma, hemangioma, neovascular glaucoma and psoriasis. Also included within this group are
15 synovitis, dermatitis, endometriosis, angiofibroma, rheumatoid arthritis, atherosclerotic plaques, corneal graft neovascularization, hemophilic joints, hypertrophic scars, osler-weber syndrome, pyogenic granuloma retrolental fibroplasia, scleroderma, trachoma, and
20 vascular adhesions. Each of the above diseases are known to have a common angio-dependent pathology, it is thus contemplated that achieving coagulation in the disease site would prove beneficial.

25 The bispecific binding ligand-coagulation factor conjugates of the present invention may be conjugates in which the two or more components are covalently linked. For example, by using a biochemical crosslinker and, preferably, one that has reasonable stability in blood,
30 as exemplified by SMPT. The components may also be linked using the well-known avidin (or streptavidin) and biotin combination. Various cross-linkers, avidin:biotin compositions and combinations, and techniques for preparing conjugates, are well known in the art and are
35 further described herein.

- 19 -

Alternatively, such bispecific coagulating agents may be fusion proteins prepared by molecular biological techniques, i.e., by joining a gene (or cDNA) encoding a binding ligand or region to a gene (or cDNA) encoding a coagulation factor. This is well known in the art and is further described herein. Typically, an expression vector is prepared that comprises, in the same reading frame, a DNA segment encoding the first binding region operatively linked to a DNA segment encoding the coagulation factor and expressing the vector in a recombinant host cell so that it produces the encoded fusion protein.

Coagulation factors for use in the invention may comprise one of the vitamin K-dependent coagulant factors, such as Factor II/IIa, Factor VII/VIIa, Factor IX/IXa or Factor X/Xa. Factor V/Va, VIII/VIIIa, Factor XI/XIa, Factor XII/XIIa and Factor XIII/XIIIa may also be used.

Particular aspects concern the vitamin K-dependent coagulation factors that lack the Gla modification. Such factors may be prepared by expressing a vitamin K-dependent coagulation factor-encoding gene in a procaryotic host cell (which cells are unable to effect the Glu to Gla modification). The factors may also be prepared by making an engineered coagulation factor gene that encodes a vitamin K-dependent coagulation factor lacking the necessary or "corresponding" Glutamic acid residues, and then expressing the engineered gene in virtually any recombinant host cell. Equally, such a coagulation factor may be prepared by treating the vitamin K-dependent coagulation factor protein to remove or alter the corresponding Glutamic acid residues.

Preferred coagulation factors for use in the binding ligands of the invention are Tissue Factor and Tissue

- 20 -

Factor derivatives. One group of useful Tissue Factors are those mutants deficient in the ability to activate Factor VII. A Tissue Factor may be rendered deficient in the ability to activate Factor VII by altering one or more amino acids from the region generally between about position 157 and about position 167 in the amino acid sequence. Exemplary mutants are those wherein Trp at position 158 is changed to Arg; wherein Ser at position 162 is changed to Ala; wherein Gly at position 164 is changed to Ala; and the double mutant wherein Trp at position 158 is changed to Arg and Ser at position 162 is changed to Ala.

Further preferred Tissue Factor derivatives are truncated Tissue Factors, dimeric or even polymeric Tissue Factors and dimeric, or even polymeric, truncated Tissue Factors.

The present invention further provides novel Tissue Factor constructs that comprise a Tissue Factor or derivative operatively linked to at least one other Tissue Factor or derivative. Truncated Tissue Factors are preferred, with truncated Tissue Factors that have been modified to comprise a hydrophobic membrane insertion moiety being particularly preferred.

"A hydrophobic membrane insertion moiety", as defined herein, is one or more units that direct the insertion or functional contact of the Tissue Factor with a membrane. The hydrophobic membrane insertion moieties of the invention are exemplified by stretches of substantially hydrophobic amino acids, such as between about 3 and about 20 hydrophobic amino acids; and also by fatty acids.

35

The hydrophobic amino acids may be located either at the N- or C-terminus of the truncated Tissue Factor, or

- 21 -

appended at another point of the molecule. Where hydrophobic amino acids are used, they may be advantageously incorporated into the molecule by molecular biological techniques. Equally, hydrophobic amino acids or fatty acids may be added to the Tissue Factor using synthetic chemistry techniques.

In the Tissue Factor dimers, trimers and polymers of the present invention, each of the Tissue Factors or derivatives may be operatively linked via, e.g., a disulfide, thioether or peptide bond. In certain embodiments, the Tissue Factor units will be linked via a bond that is substantially stable in plasma, or in the physiological environment in which it is intended for use. This is based upon the inventors' concept that the dimeric form of Tissue Factor may prove to be the most biologically active. However, there is no requirement for a stable linkage as Tissue Factor monomers are known to be active in the methods of the invention.

20

One or more of the Tissue Factors or truncated Tissue Factors in the dimers and multimers may also be modified to contain a terminal cysteine residue or another moiety that is suitable for linking the Tissue Factor construct to a second agent, such as a binding region.

Tissue Factor monomers, truncated Tissue Factors, and Tissue Factor dimers and multimers that contain a peptide that includes a selectively-cleavable amino acid sequence therefore form another aspect of the invention. Peptide linkers that include a cleavage site for urokinase, plasmin, Thrombin, Factor IXa, Factor Xa or a metalloproteinase, such as an interstitial collagenase, a gelatinase or a stromelysin, are particularly preferred.

35

- 22 -

The Tissue Factor monomers, truncated Tissue Factors, Tissue Factor dimers and multimers, and indeed any coagulant, may therefore be linked to a second agent, such as an antibody, an antigen binding region of an antibody, a ligand or a receptor, via a biologically-releasable bond. The preference for peptide linkers that include a cleavage site for the above listed proteinases is based on the presence of such proteinases within, e.g., a tumor environment. The delivery of a bispecific agent or ligand to the tumor site is expected to result in cleavage, resulting in the relatively specific release of the coagulation factor.

Particular constructs of the invention are those comprising an operatively linked series of units in the sequence: a cysteine residue, a selectively cleavable peptide linker, a stretch of hydrophobic amino acids, a first truncated Tissue Factor and a second truncated Tissue Factor; or in the sequence: a first cysteine residue, a selectively cleavable peptide linker, a first stretch of hydrophobic amino acids, a first truncated Tissue Factor, a second truncated Tissue Factor and a second stretch of hydrophobic amino acids; wherein each construct may or not be linked to a second agent such as an antibody, ligand or receptor.

Other suitable coagulation factors are Russell's viper venom Factor X activator; platelet-activating compounds, such as thromboxane A₂ and thromboxane A₂ synthase; and inhibitors of fibrinolysis, such as α 2-antiplasmin.

Also encompassed by the invention are binding ligands in which the coagulation factor is not covalently linked to the conjugate, but is non-covalently bound thereto by means of binding to a second binding region that is operatively linked to the targeting agent of the

- 23 -

construct. Suitable "second binding regions" include antigen combining sites of antibodies that have binding specificity for the coagulation factor, including functional portions of antibodies, such as scFv, Fv, Fab', Fab and F(ab')₂ fragments.

Binding ligands that contain antibodies, or fragments thereof, directed against the vitamin K-dependent coagulant Factor II/IIa, Factor VII/VIIa, Factor IX/IXa or Factor X/Xa; a vitamin K-dependent coagulation factor that lacks the Gla modification; Tissue Factor, a mutant Tissue Factor, a truncated Tissue Factor, a dimeric Tissue Factor, a polymeric Tissue Factor, a dimeric truncated Tissue Factor; Prekallikein; Factor V/Va, VIII/VIIIa, Factor XI/XIa, Factor XII/XIIa, Factor XIII/XIIIa; Russell's viper venom Factor X activator, thromboxane A₂ or α 2-antiplasmin are therefore contemplated.

The non-covalently bound coagulating agents may be bound to, or "precomplexed", with a coagulation factor, e.g., so that they may be used to deliver an exogenous coagulation factor to a disease site, e.g., the tumor vasculature, of an animal upon administration. Equally, binding ligands that comprise a second binding region that is specific for a coagulation factor may also be administered to an animal in an "uncomplexed" form and still function to achieve specific coagulation; in which instance, the agent would garner circulating (endogenous) coagulation factor and concentrate it within the disease or tumor site.

In terms of the "coagulation factors" or coagulating agents, these may be endogenous coagulation factors and derivatives thereof, or exogenously added version of such factors, including recombinant versions. Coagulants (in the present "coaguligands") have the distinct advantage

- 24 -

over toxins (in immunotoxins) as they will not produce significant adverse side effects upon targeting to a marker that proves to be less than 100% disease-restricted. Furthermore, the coagulants used will most often be of human origin, and will therefore pose less immunogenicity problems than foreign toxins, such as ricin A chain.

Although not limited to such compositions, important examples of compositions in accordance with this invention are bispecific antibodies, which antibodies comprise a first antigen binding region that binds to a disease cell or component of disease-associated vasculature marker and a second antigen binding region that binds to a coagulation factor. The invention also provides scFv, Fv, Fab', Fab and F(ab')₂ fragments of such bispecific antibodies. One currently preferred example of such a bispecific antibody is an antibody comprising one binding site directed against an MHC Class II antigen and another binding site directed against Tissue Factor.

In further embodiments, the present invention provides pharmaceutical compositions of, and therapeutic kits comprising, any or a combination of the above binding ligands and bispecific antibodies in pharmacologically acceptable forms. This includes pharmaceutical compositions and kits where the binding ligand has a first binding region that is covalently linked to a coagulation factor, and also binding ligands in which the first binding region is covalently linked to a second binding region that, in turn, binds to the coagulation factor - whether binding occurs prior to, or subsequent to, administration to an animal.

Pharmaceutical compositions and therapeutic kits that include a combination of bispecific, trispecific or

- 25 -

multispecific binding ligands in accordance with the invention are also contemplated. This includes combinations where one binding ligand is directed against a diseased cell or a tumor cell and where another is
5 directed against a vasculature endothelial cell marker or component of disease-associated stroma. Other distinct components may also be included in the compositions and kits of the invention, such as antibodies, immunotoxins, immunoeffectors, chemotherapeutic agents, and the like.

10

The kits may also include an antigen suppressor, such as a cyclosporin, for use in suppressing antigen expression in endothelial cells of normal tissues; and/or an "inducing agent" for use in inducing disease-
15 associated vascular endothelial cells or stroma to express a targetable antigen, such as E-selectin, P-selectin or an MHC Class II antigen. Exemplary inducing agents include T cell clones that bind disease or tumor antigens and that produce IFN- γ , although it is
20 currently preferred that such clones be isolated from the animal to be treated using the kit.

Preferred inducing agents are bispecific antibodies that bind to disease or tumor cell antigens, or even
25 stromal components, and to effector cells capable of producing cytokines, coagulants, or other factors, that induce expression of desired target antigens. Currently, one preferred group of bispecific antibodies are those that bind to a tumor antigen and to the activation
30 antigens CD14 or CD16, to stimulate IL-1 production by monocytes, macrophages or mast cells; and those that bind to a tumor antigen and to the activation antigens CD2, CD3 or CD28, and preferably CD28, to stimulate IFN- γ production by NK cells or preferably by T cells.

35

A second preferred group of bispecific antibodies are those that bind to a tumor antigen or to a component

- 26 -

of tumor stroma, and to Tissue Factor, a Tissue Factor derivative, prothrombin, Factor VII/VIIa, Factor IX/IXa, Factor X/Xa, Factor XI/XIa or Russell's viper venom Factor X activator, to stimulate thrombin production.

5 Kits comprising such bispecific antibodies as a first "inducing" composition will generally include a second pharmaceutical composition that comprises a binding ligand that comprises a first binding region that binds to P-selectin or E-selectin.

10

The bispecific ligands of the invention, and other components as desired, may be conveniently aliquoted and packaged, using one or more suitable container means, and the separate containers dispensed in a single package.

15 Pharmaceutical compositions and kits are further described herein.

Although the present invention has significant clinical utility in the delivery of coagulants and in
20 disease treatment, it also has many *in vitro* uses. These include, for example, various assays based upon the binding ability of the particular antibody, ligand or receptor, of the bispecific compounds. The bispecific coagulating ligands of invention may thus be employed in
25 standard binding assays and protocols, such as in immunoblots, Western blots, dot blots, RIAs, ELISAs, immunohistochemistry, fluorescent activated cell sorting (FACS), immunoprecipitation, affinity chromatography, and the like, as further described herein.

30

In still further embodiments, the invention concerns methods for delivering a coagulant to disease-associated vasculature, as may be used to treat diseases such as diabetic retinopathy, vascular restenosis, AVM,
35 hemangioma, neovascular glaucoma, psoriasis and rheumatoid arthritis, and tumors that have a vascularized tumor component. Such methods generally comprise

- 27 -

administering to an animal, including a human subject,
with a disease that has a vascular component, a
pharmaceutical composition comprising at least one
bispecific binding ligand in accordance with those
5 described above.

The compositions are administered in amounts and by
routes effective to promote blood coagulation in the
vasculature of the disease site, e.g., a solid tumor.
10 Effective doses will be known to those of skill in the
art in light of the present disclosure, such as the
information in the Preferred Embodiments and Detailed
Examples. Parenteral administration will often be
suitable, as will other methods, such as, e.g., injection
15 into a vascularized tumor site.

The methods of the invention provide for the
delivery of exogenous coagulation factors, by means of
both administering a binding ligand that comprises a
20 covalently-bound coagulation factor and by means of
administering a binding ligand that comprises a
non-covalently bound coagulation factor that is complexed
to a second binding region of the bispecific ligand or
antibody.

25

Further methods of the invention include those that
result in the delivery of an endogenous coagulation
factor to disease or tumor vasculature. This is achieved
by administering to the animal or patient a binding
30 ligand that comprises a second binding region that binds
to endogenous coagulation factor and concentrates the
factor at the disease-associated or tumor vasculature.

In yet still further methodological embodiments, it
35 is contemplated that markers of tumor vasculature or
stroma may be specifically induced and then targeted
using a binding ligand, such as an antibody. Exemplary

- 28 -

inducible antigens include E-selectin, P-selectin, MHC Class II antigens, VCAM-1, ICAM-1, endoglin, ligands reactive with LAM-1, vascular addressins and other adhesion molecules, with E-selectin and MHC Class II antigens being currently preferred.

When inducing and subsequently targeting MHC Class II proteins, the suppression of MHC Class II in normal tissues is generally required. MHC Class II suppression may be achieved using a cyclosporin, or a functionally equivalent agent. MHC Class II molecules may then be induced in disease-associated vascular endothelial cells using cyclosporin-independent means, such as by exposing the disease-associated vasculature to an effector cell, generally a Helper T cell or NK cell, of the animal that releases the inducing cytokine IFN- γ .

Activated monocytes, macrophages and even mast cells are effector cells capable of producing cytokines (IL-1; TNF- α ; TNF- β) that induce E-selectin; whereas Helper T cells, CD8-positive T cells and NK cells are capable of producing IFN- γ that induces MHC Class II. Activating monocyte/macrophages in the disease site to produce IL-1, or activating disease-associated Helper T cells or NK cells to produce IFN- γ , may be achieved by administering to the animal an activating antibody that binds to an effector cell surface activating antigen. Exemplary activating antigens include CD14 and CD16 (FcR for IgE) for monocytes/macrophages; and CD2, CD3 and CD28 for T cells; with CD14 and CD28, respectively, being preferred for use in certain embodiments.

To achieve specific activation and induction, one currently preferred method is to use a bispecific antibody that binds to both an effector cell activating antigen, such as CD14 or CD28, and to a disease or tumor cell antigen. These bispecific antibodies will localize

- 29 -

to the disease or tumor site and activate monocyte/macrophages and T cells, respectively. The activated effector cells in the vicinity of the targeted disease or tumor component will produce inducing
5 cytokines, in this case, IL-1 and IFN- γ , respectively.

MHC Class II suppression in normal tissues may also be achieved by administering to an animal an anti-CD4 antibody; this functions to suppress IFN- γ production by
10 T cells of the animal resulting in inhibition of MHC Class II expression. MHC Class II molecules may again be specifically induced in disease-associated vascular endothelial cells by exposing only the disease site to IFN- γ . One means by which to achieve this is by
15 administering to the animal an IFN- γ -producing T cell clone that binds to an antigen in the disease site. The IFN- γ -producing T cells will preferably be infiltrating leukocytes obtained from the disease site of the animal, such as tumor infiltrating leukocytes (TILs) expanded in
20 vitro.

Methods using bispecific antibodies to induce coagulant, such as thrombin, production, only in a local environment, such as in a tumor site, are also provided.
25 Again, this will generally be achieved by administering to an animal a pharmaceutical composition comprising a bispecific antibody that binds to a tumor cell or a component of tumor stroma and to Tissue Factor, a Tissue Factor derivative, prothrombin, Factor VII/VIIa,
30 Factor IX/IXa, Factor X/Xa, Factor XI/XIa or Russell's viper venom Factor X activator. Antibodies that bind to E-selectin or P-selectin are then linked to a coagulation factor or a second binding region that binds to a coagulation factor and are introduced into the
35 bloodstream of an animal.

- 30 -

More conventional combination treatment regimens are also possible where, for example, a tumor coagulating element of this invention is combined with an existing antitumor therapy, such as with radiotherapy or chemotherapy, or through the use of a second immunological reagent, such as an antitumor immunotoxin. The novel treatment methods for benign diseases can also be combined with other presently used therapies.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The following drawings form part of the present specification and are included to further demonstrate certain aspects of the present invention. The invention may be better understood by reference to one or more of these drawings in combination with the detailed description of specific embodiments presented herein.

FIG. 1. Tethering of tTF to A20 cells via B21-2/10H10 bispecific antibody. A20 cells were incubated with varying concentrations of B21-2/10H10 (\square), SFR8/10H10 (\bullet) or B21-2/OX7 (\circ) plus an excess of ^{125}I -tTF for 1 h at 4°C in the presence of sodium azide. The number of ^{125}I -tTF associated with the cells was determined as described in Example II.

FIG. 2. Relationship between number of tethered tTF molecules per A20 cell and ability to induce coagulation of plasma. A20 cells were incubated with varying concentrations of B21-2/10H10 plus an excess of tTF for 1 h at 4°C in the presence of sodium azide. The cells were washed, warmed to 37°C , calcium and mouse plasma were added and the time for the first fibrin strands to form was recorded (abscissa). An identical study was performed in which the A20 cells were incubated for 1 h at 4°C with bispecific antibody plus ^{125}I -tTF and the

- 31 -

number of tTF specifically bound to the cells was determined as described in Example II (ordinate). Plasma added to untreated A20 cells (i.e. zero tTF molecules/cell) coagulated in 190 seconds.

5

FIG. 3A, FIG. 3B, FIG. 3C and FIG. 3D. Time course of vascular thrombosis and tumor necrosis after administration of coaguligand. Groups of 3 mice bearing 0.8 cm diameter C1300 (Muγ) tumors were given an intravenous injection of a coaguligand composed of 14 μg B21-2/10H10 and 11 μg tTF. FIG. 3A; Before injection: blood vessels are intact and tumor cells are healthy. FIG. 3B; 0.5 hours: blood vessels throughout the tumor are thrombosed; tumor cells are healthy. FIG. 3C; 4 hours: dense thrombi are present in all tumor vessels and tumor cells are separating and developing pyknotic nuclei. Erythrocytes are visible in the tumor interstitium. FIG. 3D; 24 hours: advanced tumor necrosis throughout the tumor. Arrows indicate blood vessels.

FIG. 4. Solid tumor regression induced by tumor-vasculature directed coaguligand therapy. Nu/nu mice bearing approximately 0.8 cm diameter C1300 (Muγ) tumors were given two intravenous injections of B21-2/10H10 (14 μg) mixed with tTF (11 μg) spaced 1 week apart (arrows) (□). Mice in control groups received equivalent doses of tTF alone (●), B21-2/10H10 alone (○) or diluent (■). Other control groups which received equivalent doses of isotype-matched control bispecific antibodies (SFR8/10H10, OX7/10H10 or B21-2/OX7) and tTF had similar tumor responses to those in animals receiving tTF alone. The number of mice per group was 7 or 8.

FIG. 5. Exemplary antibody-tTF constructs. This FIG. shows both the conjugates synthesized by the linkage of chemically derivatized antibody to chemically derivatized

- 32 -

tTF via a disulfide bond, and also the linkage of various TF or TF dimers to antibodies and fragments thereof.

FIG. 6. Clotting activity of tTF conjugates when bound to A20 cells. A20 cells were incubated with varying concentrations of B21-2/10H10 bispecific + H₆[tTF] in a 1:1 molar ratio, premixed for one hour (□), B21-2 antibody-H₆ C[tTF] (●), and B21-2 antibody-H₆[tTF] (▲) for 1 hour at 4°C in the presence of sodium azide. The cells were washed, warmed to 37°C, calcium and mouse plasma were added and the time for the first fibrin strands to form was recorded. The results are expressed as clotting time as a % of the clotting time in the absence of tTF.

FIG. 7. Clotting activity of anti-tumor cell tTF conjugates. LS174T cells (■), Widr cells (●) and H460 cells (▲), preincubated with TF9-6B4 and TF8-5G9 antibodies, were incubated with varying concentrations of D612 antibody-H₆C[tTF] (■), KS1/4 antibody-H₆[tTF] (●), and XMMCO791 antibody-H₆[tTF] (▲) for 1 hour at 4°C in the presence of sodium azide. The cells were washed, warmed to 37°C, calcium and mouse plasma were added and the time for the first fibrin strands to form was recorded. The results are expressed as clotting time as a % of the clotting time in the absence of tTF.

FIG. 8. Gla domains (γ-carboxyglutamic acid) of Factor II/IIa, Factor VII/IIa, Factor IX/IXa and Factor X/Xa. The arrows represent signal peptide and pro-peptide cleavage sites and activating cleavage sites (slanted arrows).

- 33 -

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

Although they show great promise in the therapy of lymphomas and leukemias (Lowder et al., 1987; Vitetta et al., 1991), monoclonal antibodies (MAbs) and immunotoxins (ITs) have thus far proved relatively ineffective in clinical trials against carcinomas and other solid tumors (Byers & Baldwin, 1988; Abrams & Oldham, 1985), which account for more than 90% of all cancers in man (Shockley et al., 1991). A principal reason for this is that macromolecules do not readily extravasate into solid tumors (Sands, 1988; Epenetos et al., 1986) and, once within the tumor mass, fail to distribute evenly due to the presence of tight junctions between tumor cells (Dvorak et al., 1991), fibrous stroma (Baxter et al., 1991), interstitial pressure gradients (Jain, 1990) and binding site barriers (Juweid et al., 1992).

In developing new strategies for treating solid tumors, the methods that involve targeting the vasculature of the tumor, rather than the tumor cells themselves, therefore seem to offer certain advantages. Inducing a blockade of the blood flow through the tumor, e.g., through tumor vasculature specific fibrin formation, would interfere with the influx and efflux processes in a tumor site, thus resulting in anti-tumor effect. Arresting the blood supply to a tumor may be accomplished through shifting the procoagulant-fibrinolytic balance in the tumor-associated vessels in favour of the coagulating processes by specific exposure to coagulating agents.

The present invention provides various means for effecting specific blood coagulation, as exemplified by tumor-specific coagulation. This is achieved using bispecific or multispecific binding ligands in which at

- 34 -

least one component is an immunological- or growth factor-based targeting component, and at least one other component is provided that is capable of directly, or indirectly, stimulating coagulation.

5

A. Targetable Disease Sites

The compositions and methods provided by this invention are broadly applicable to the treatment of any disease, such as a benign or malignant tumor, having a vascular component. Such vasculature-associated diseases include BPH, diabetic retinopathy, vascular restenosis, arteriovenous malformations (AVM), meningioma, hemangioma, neovascular glaucoma and psoriasis; and also angiofibroma, arthritis, atherosclerotic plaques, corneal graft neovascularization, hemophilic joints, hypertrophic scars, osler-weber syndrome, pyogenic granuloma retrolental fibroplasia, scleroderma, trachoma, vascular adhesions, synovitis, dermatitis and even endometriosis.

20

Typical vascularized tumors are the solid tumors, particularly carcinomas, which require a vascular component for the provision of oxygen and nutrients. Exemplary solid tumors that may be treated using the invention include, but are not limited to, carcinomas of the lung, breast, ovary, stomach, pancreas, larynx, esophagus, testes, liver, parotid, biliary tract, colon, rectum, cervix, uterus, endometrium, kidney, bladder, prostate, thyroid, squamous cell carcinomas, adenocarcinomas, small cell carcinomas, melanomas, gliomas, neuroblastomas, and the like.

30

One binding region of the bispecific agents of the invention will be a component that is capable of delivering the coagulating agent to the tumor region, i.e., capable of localizing within a tumor site, such as those described above. As somewhat wider distribution of

35

- 35 -

the coagulating agent will not be associated with severe side effects, such as is known to occur with a toxin moiety, there is a less stringent requirement imposed on the targeting element of the bispecific ligand. The
5 targeting agent may thus be directed to components of tumor cells; components of tumor vasculature; components that bind to, or are generally associated with, tumor cells; components that bind to, or are generally associated with, tumor vasculature; components of the
10 tumor extracellular matrix or stroma; and even cell types found within the tumor vasculature.

The burden of very stringent targeting, e.g., as imposed when using immunotoxins, is also lessened due to
15 the fact that tumor vasculature is 'prothrombotic' and is predisposed towards coagulation. Therefore, to achieve specific targeting means that coagulation is promoted in the tumor vasculature relative to the vasculature in non-tumor sites. Thus, specific targeting is a functional
20 term rather than a purely physical term relating to the biodistribution properties of the targeting agent, and it is not unlikely that useful targets may be not be entirely tumor-restricted, and that targeting ligands which are effective to promote tumor-specific coagulation
25 may nevertheless be found at other sites of the body following administration.

1. Tumor Cell Targets

30 The malignant cells that make up the tumor may be targeted using a bispecific ligand that has a region capable of binding to a relatively specific marker of the tumor cell. In that binding to tumor cells will localize the associated coagulating agent to the tumor, specific
35 coagulation will be achieved. Furthermore, it is expected that this would be a particularly effective means of promoting coagulation as, due to the physical

- 36 -

accessibility of perivascular tumor cells, the bispecific agents will likely be concentrated around the tumor cells that are nearest to a blood vessel.

5 Many so-called "tumor antigens" have been described, any one which could be employed as a target in connection with the present invention. A large number of exemplary solid tumor-associated antigens are listed herein in Table I. The preparation and use of antibodies against
10 such antigens is well within the skill of the art, and exemplary antibodies are also listed in Table I.

 Another means of defining a targetable tumor is in terms of the characteristics of a tumor cell itself,
15 rather than describing the biochemical properties of an antigen expressed by the cell. Accordingly, Table II is provided for the purpose of exemplifying human tumor cell lines that are publically available (from ATCC Catalogue).

20 The information presented in Table II is by means of an example, and not intended to be limiting either by year or by scope. One may consult the ATCC Catalogue of any subsequent year to identify other appropriate cell
25 lines. Also, if a particular cell type is desired, the means for obtaining such cells, and/or their instantly available source, will be known to those of skill in the particular art. An analysis of the scientific literature will thus readily reveal an appropriate choice of cell
30 for any tumor cell type desired to be targeted.

-37-

TABLE I
MARKER ANTIGENS OF SOLID TUMORS AND
CORRESPONDING MONOCLONAL ANTIBODIES

Tumor Site	Antigen Identity/ Characteristics	Monoclonal Antibodies	Reference
A: Gynecological			
GY	'CA 125' >200 kD mucin GP	OC 125	Kabawat et al., 1983; Szymendera, 1986
ovarian	80 Kd GP	OC 133	Masuko et al, Cancer Res., 1984
ovarian	'SGA' 360 Kd GP	OMI	de Krestet et al., 1986
ovarian	High M _r mucin	Mo v1	Miotti et al, Cancer Res., 1985
ovarian	High M _r mucin/ glycolipid	Mo v2	Miotti et al, Cancer Res., 1985
ovarian	NS	3C2	Tsuji et al., Cancer Res., 1985
ovarian	NS	4C7	Tsuji et al., Cancer Res., 1985
ovarian	High M _r mucin	ID ₃	Gangopadhyay et al., 1985
ovarian	High M _r mucin	DU-PAN-2	Lan et al., 1985
GY	7700 Kd GP	F 36/22	Croghan et al., 1984
ovarian	'gp 68' 48 Kd GP	4F ₇ /7A ₁₀	Bhattacharya et al., 1984
GY	40, 42kD GP	OV-TL3	Poels et al., 1986
GY	'TAG-72' High M _r mucin	B72.3	Thor et al., 1986

5

10

15

20

- 38 -

TABLE I continued...

Tumor Site	Antigen Identity/ Characteristics	Monoclonal Antibodies	Reference
ovarian	300-400 Kd GP	DF ₃	Kufe et al., 1984
ovarian	60 Kd GP	2C ₈ /2F ₇	Bhattacharya et al., 1985
GY	105 Kd GP	MF 116	Mattes et al., 1984
ovarian	38-40 kD GP	MOV18	Miotti et al., 1987
GY	'CEA' 180 Kd GP	CEA 11-H5	Wagner et al., 1984
ovarian	CA 19-9 or GICA	CA 19-9 (1116NS 19-9)	Atkinson et al., 1982
ovarian	'PLAP' 67 Kd GP	H17-E2	McDicken et al., 1985
ovarian	72 Kd	791T/36	Perkins et al., 1985
ovarian	69 Kd PLAP	NDOG ₂	Sunderland et al., 1984
ovarian	unknown M _r PLAP	H317	Johnson et al., 1981
ovarian	p185 ^{HER2}	4D5, 3H4, 7C2, 6E9, 2C4, 7F3, 2H11, 3E8, 5B8, 7D3, SB8	Shepard et al., 1991
uterus ovary	HMFG-2	HMFG2	Epenetos et al., 1982
GY	HMFG-2	3.14.A3	Burchell et al., 1983

5

10

-39-

TABLE I continued...

Tumor Site	Antigen Identity/ Characteristics	Monoclonal Antibodies	Reference
<u>B: BREAST</u>	330-450 Kd GP	DF3	Hayes et al., 1985
	NS	NCRC-11	Ellis et al., 1984
	37kD	3C6F9	Mandeville et al., 1987
	NS	MBE6	Teramoto et al., 1982
	NS	CLNH5	Glassy et al., 1983
	47 Kd GP	MAC 40/43	Kjeldsen et al., 1986
	High M _r GP	EMA	Sloane et al., 1981
	High M _r GP	HMFG1 HFMG2	Arklie et al., 1981
	NS	3.15.C3	Arklie et al., 1981
	NS	M3, M8, M24	Foster et al., 1982
	1 (Ma) blood group Ags	M18	Foster et al., 1984
	NS	67-D-11	Rasmussen et al., 1982
	oestrogen receptor	D547Sp, D75P3, H222	Kinsel et al., 1989
	EGF Receptor	Anti-EGF	Sainsbury et al., 1985
	Laminin Receptor	LR-3	Horan Hand et al., 1985
	erb B-2 p185	TA1	Gusterson et al., 1988
	NS	H59	Hendler et al., 1981

5

10

15

- 40 -

TABLE I continued...

Tumor Site	Antigen Identity/ Characteristics	Monoclonal Antibodies	Reference
	126 Kd GP	10-3D-2	Soule et al., 1983
	NS	HmAB1,2	Imam et al., 1984; Schlom et al., 1985
	NS	MBR 1,2,3	Menard et al., 1983
	95 Kd	24-17-1	Thompson et al., 1983
	100 Kd	24-17-2 (3E1-2)	Croghan et al., 1983
	NS	F36/22.M7/10 ₅	Croghan et al., 1984
	24 Kd	C11, G3, H7	Adams et al., 1983
	90 Kd GP	B6-2	Colcher et al., 1981
	CEA & 180 Kd GP	B1-1	Colcher et al., 1983
	colonic & pancreatic mucin similar to Ca 19- 9	Cam 17-1	Imperial Cancer Research Technology Mab listing
	milk mucin core protein	SM3	Imperial Cancer Research Technology Mab listing
	milk mucin core protein	SM4	Imperial Cancer Research Technology Mab listing
	affinity-purified milk mucin	C-Mul (566)	Imperial Cancer Research Technology Mab listing

5

10

-41-

TABLE I continued....

Tumor Site	Antigen Identity/ Characteristics	Monoclonal Antibodies	Reference
	p185 ^{HER2}	4D5 3H4, 7C2, 6E9, 2C4, 7F3, 2H11, 3E8, 5B8, 7D3, 5B8	Shepard et al., 1991
	CA 125 >200 Kd GP	OC 125	Kabawat et al., 1985
	High M _r mucin/ glycolipid	MO v2	Miotti et al., 1985
	High M _r mucin	DU-PAN-2	Lan et al., 1984
	'gp48' 48 Kd GP	4F ₇ /7A ₁₀	Bhattacharya et al., 1984
	300-400 Kd GP	DF ₃	Kufe et al., 1984
	'TAG-72' high M _r mucin	B72·3	Thor et al., 1986
	'CEA' 180 Kd GP	ccccCEA 11	Wagener et al., 1984
	'PLAP' 67 Kd GP	H17-E2	McDicken et al., 1985
	HMFG-2 >400 Kd GP	3·14·A3	Burchell et al., 1983
	NS	FO23C5	Riva et al., 1988
C: COLORECTAL	TAG-72 High M _r mucin	B72·3	Colcher et al., 1987
	GP37	(17-1A) 1083-17-1A	Paul et al., 1986

- 42 -

TABLE I continued...

Tumor Site	Antigen Identity/ Characteristics	Monoclonal Antibodies	Reference
	Surface GP	CO17-1A	LoBuglio et al., 1988
	CEA	ZCE-025	Patt et al., 1988
	CEA	AB2	Griffin et al., 1988a
	cell surface AG	HT-29-15	Cohn et al., 1987
	secretory epithelium	250-30.6	Leydem et al., 1986
	surface glycoprotein	44X14	Gallagher et al., 1986
	NS	A7	Takahashi et al., 1988
	NS	GA73.3	Munz et al., 1986
	NS	791T/36	Farrans et al., 1982
	cell membrane & cytoplasmic Ag	28A32	Smith et al., 1987
	CEA & vindesine	28.19.8	Corvalen, 1987
	gp72	X MMCO-791	Byers et al., 1987
	high M _r mucin	DU-PAN-2	Lan et al., 1985
	high M _r mucin	ID ₃	Gangopadhyay et al., 1985
	CEA 180 Kd GP	CEA 11-H5	Wagener et al., 1984
	60 Kd GP	2C ₈ /2F ₇	Bhattacharya et al., 1985

5

10

15

- 43 -

TABLE I continued...

Tumor Site	Antigen Identity/ Characteristics	Monoclonal Antibodies	Reference
	CA-19-9 (or GICA)	CA-19-9 (1116NS 19-9)	Atkinson et al., 1982
	Lewis a	PR5C5	Imperial Cancer Research Technology Mab Listing
	Lewis a	PR4D2	Imperial Cancer Research Technology Mab Listing
	colonic mucus	PR4D1	Imperial Cancer Research Technology Mab Listing
<u>D: MELANOMA</u>	p97a	4·1	Woodbury et al., 1980
	p97a	8·2 M ₁₇	Brown, et al., 1981a
	p97b	96·5	Brown, et al., 1981a
	p97c	118·1, 133·2, (113·2)	Brown, et al., 1981a
	p97c	L ₁ , L ₁₀ , R ₁₀ (R ₁₉)	Brown et al., 1981b
	p97d	I ₁₂	Brown et al., 1981b
	p97e	K ₅	Brown et al., 1981b
	p155	6·1	Loop et al., 1981
	Gp ₃ disialogan- glioside	R24	Dippold et al., 1980

- 44 -

TABLE I continued...

Tumor Site	Antigen Identity/ Characteristics	Monoclonal Antibodies	Reference
	p210, p60, p250	5.1	Loop et al., 1981
	p280 p440	225.28S	Wilson et al., 1981
	GP 94, 75, 70 & 25	465.12S	Wilson et al., 1981
	P240-P250, P450	9.2.27	Reisfeld et al., 1982
	100, 77, 75 Kd	F11	Chee et al., 1982
	94 Kd	376.96S	Imai et al., 1982
	4 GP chains	465.12S	Imai et al., 1982; Wilson et al., 1981
	GP 74	15.75	Johnson & Reithmuller, 1982
	GP 49	15.95	Johnson & Reithmuller, 1982
	230 Kd	Mel-14	Carrel et al., 1982
	92 Kd	Mel-12	Carrel et al., 1982
	70 Kd	Me3-TB7	Carrel et al., 1:387, 1982
	HMW MAA similar to 9.2.27 AG	225.28SD	Kantor et al., 1982
	HMW MAA similar to 9.2.27 AG	763.24TS	Kantor et al., 1982
	GP95 similar to 376.96S 465.12S	705F6	Stuhlmiller et al., 1982
	GP125	436910	Saxton et al., 1982

5

10

15

- 45 -

TABLE I continued...

Tumor Site	Antigen Identity/ Characteristics	Monoclonal Antibodies	Reference
	CD41	M148	Imperial Cancer Research Technology Mab listing
<u>E:</u> <u>GASTROINTESTI</u> <u>NAL</u>	high M_r mucin	ID3	Gangopadhyay et al., 1985
pancreas, stomach			
gall bladder, pancreas, stomach	high M_r mucin	DU-PAN-2	Lan et al., 1985
pancreas	NS	OV-TL3	Poels et al., 1984
pancreas, stomach, oesophagus	'TAG-72' high M_r mucin	B72.3	Thor et al., 1986
stomach	'CEA' 180 Kd GP	CEA 11-H5	Wagener et al., 1984
pancreas	HMEG-2 >400 Kd GP	3.14.A3	Burchell et al., 1983
G.I.	NS	C COLI	Lemkin et al., 1984
pancreas, stomach	CA 19-9 (or GICA)	CA-19-9 (1116NS 19- 9) and CA50	Szymendera, 1986
pancreas	CA125 GP	OC125	Szymendera, 1986

5

10

15

20

-46-

TABLE I continued...

Tumor Site	Antigen Identity/ Characteristics	Monoclonal Antibodies	Reference
<u>F: LUNG</u>	p185 ^{HER2}	4D5 3H4, 7C2, 6E9, 2C4, 7F3, 2H11, 3E8, 5B8, 7D3, SB8	Shepard et al., 1991
non-small cell lung carcinoma			
	high M _r mucin/ glycolipid	MO v2	Miotti et al., 1985
	'TAG-72' high M _r mucin	B72.3	Thor et al., 1986
	high M _r mucin	DU-PAN-2	Lan et al., 1985
	'CEA' 180 kD GP	CEA 11-H5	Wagener et al., 1984
Malignant Gliomas	cytoplasmic antigen from 85HG-22 cells	MUC 8-22	Stavrou, 1990
	cell surface Ag from 85HG-63 cells	MUC 2-63	Stavrou, 1990
	cell surface Ag from 86HG-39 cells	MUC 2-39	Stavrou, 1990

5

10

-47-

TABLE I continued...

Tumor Site	Antigen Identity/ Characteristics	Monoclonal Antibodies	Reference
	cell surface Ag from 86HG-39 cells	MUC 7-39	Stavrou, 1990
G: MISCELLANEOUS	p53	PAb 240 PAb 246 PAb 1801	Imperial Cancer Research Technology MaB Listing
small round cell tumors	neural cell adhesion molecule	ERIC-1	Imperial Cancer Research Technology MaB Listing
medulloblastoma neuroblastoma rhabdomyosarcoma		M148	Imperial Cancer Research Technology MaB Listing
neuroblastoma		FMH25	Imperial Cancer Research Technology MaB Listing
renal cancer & glioblastomas	p155	6-1	Loop et al., 1981
bladder & laryngeal cancers	"Ca Antigen" 350- 390 kD	CA1	Ashall et al., 1982
neuroblastoma	GD2	3F8	Cheung et al., 1986
Prostate	gp48 48 kD GP	4F ₇ /7A ₁₀	Bhattacharya et al., 1984
Prostate	60 kD GP	2C ₈ /2F ₇	Bhattacharya et al., 1985

TABLE I continued...

Tumor Site	Antigen Identity/ Characteristics	Monoclonal Antibodies	Reference
Thyroid	'CEA' 180 kD GP	CEA 11-H5	Wagener et al., 1984

5 abbreviations: Abs, antibodies; Ags, antigens; EGF, epidermal growth factor; GI, gastrointestinal; GICA, gastrointestinal-associated antigen; GP, glycoprotein; GY, gynecological; HMFG, human milk fat globule; Kd, kilodaltons; Mabs, monoclonal antibodies; M_r, molecular weight; NS, not specified; PLAP, placental alkaline phosphatase; TAG, tumor-associated glycoprotein; CEA, carcinoembryonic antigen.

10 footnotes: the CA 19-9 Ag (GICA) is sialosylfucosyllactotetraosylceramide, also termed sialylated Lewis pentaglycosyl ceramide or sialylated lacto-N-fucopentaose II; p97 Ags are believed to be chondroitin sulphate proteoglycan; antigens reactive with Mab 9.2.27 are believed to be sialylated glycoproteins associated with chondroitin sulphate proteoglycan; unless specified, GY can include cancers of the cervix, endocervix, endometrium, fallopian tube, ovary, vagina or mixed Mullerian tumor; unless specified GI can include cancers of the liver, small intestine, spleen, pancreas, stomach and oesophagus.

15

- 49 -

TABLE II
HUMAN TUMOR CELL LINES AND SOURCES

	ATTC HTB NUMBER	CELL LINE	TUMOR TYPE
5	1	J82	Transitional-cell carcinoma, bladder
	2	RT4	Transitional-cell papilloma, bladder
	3	ScaBER	Squamous carcinoma, bladder
	4	T24	Transitional-cell carcinoma, bladder
	5	TCCSUP	Transitional-cell carcinoma, bladder, primary grade IV
10	9	5637	Carcinoma, bladder, primary
	10	SK-N-MC	Neuroblastoma, metastasis to supra-orbital area
	11	SK-N-SH	Neuroblastoma, metastasis to bone marrow
	12	SW 1088	Astrocytoma
	13	SW 1783	Astrocytoma
15	14	U-87 MG	Glioblastoma, astrocytoma, grade III
	15	U-118 MG	Glioblastoma
	16	U-138 MG	Glioblastoma
	17	U-373 MG	Glioblastoma, astrocytoma, grade III
	18	Y79	Retinoblastoma
20	19	BT-20	Carcinoma, breast
	20	BT-474	Ductal carcinoma, breast
	22	MCF7	Breast adenocarcinoma, pleural effusion
	23	MDA-MB- 134-VI	Breast, ductal carcinoma, pleural effusion
	24	MDA-MD- 157	Breast medulla, carcinoma, pleural effusion
25	25	MDA-MB- 175-VII	Breast, ductal carcinoma, pleural effusion
	27	MDA-MB- 361	Adenocarcinoma, breast, metastasis to brain

TABLE II continued...

- 50 -

	ATTC HTB NUMBER	CELL LINE	TUMOR TYPE
	30	SK-BR-3	Adenocarcinoma, breast, malignant pleural effusion
	31	C-33 A	Carcinoma, cervix
	32	HT-3	Carcinoma, cervix, metastasis to lymph node
	33	ME-180	Epidermoid carcinoma, cervix, metastasis to omentum
5	34	MS751	Epidermoid carcinoma, cervix, metastasis to lymph node
	35	SiHa	Squamous carcinoma, cervix
	36	JEG-3	Choriocarcinoma
	37	Caco-2	Adenocarcinoma, colon
	38	HT-29	Adenocarcinoma, colon, moderately well-differentiated grade II
10	39	SK-CO-1	Adenocarcinoma, colon, ascites
	40	HuTu 80	Adenocarcinoma, duodenum
	41	A-253	Epidermoid carcinoma, submaxillary gland
	43	FaDu	Squamous cell carcinoma, pharynx
	44	A-498	Carcinoma, kidney
15	45	A-704	Adenocarcinoma, kidney
	46	Caki-1	Clear cell carcinoma, consistent with renal primary, metastasis to skin
	47	Caki-2	Clear cell carcinoma, consistent with renal primary
	48	SK-NEP-1	Wilms' tumor, pleural effusion
	49	SW 839	Adenocarcinoma, kidney
20	52	SK-HEP-1	Adenocarcinoma, liver, ascites
	53	A-427	Carcinoma, lung
	54	Calu-1	Epidermoid carcinoma grade III, lung, metastasis to pleura
	55	Calu-3	Adenocarcinoma, lung, pleural effusion
	56	Calu-6	Anaplastic carcinoma, probably lung

TABLE II continued...

- 51 -

	ATTC HTB NUMBER	CELL LINE	TUMOR TYPE
	57	SK-LU-1	Adenocarcinoma, lung consistent with poorly differentiated, grade III
	58	SK-MES-1	Squamous carcinoma, lung, pleural effusion
	59	SW 900	Squamous cell carcinoma, lung
	60	EB1	Burkitt lymphoma, upper maxilla
5	61	EB2	Burkitt lymphoma, ovary
	62	P3HR-1	Burkitt lymphoma, ascites
	63	HT-144	Malignant melanoma, metastasis to subcutaneous tissue
	64	Malme-3M	Malignant melanoma, metastasis to lung
	66	RPMI-7951	Malignant melanoma, metastasis to lymph node
10	67	SK-MEL-1	Malignant melanoma, metastasis to lymphatic system
	68	SK-MEL-2	Malignant melanoma, metastasis to skin of thigh
	69	SK-MEL-3	Malignant melanoma, metastasis to lymph node
	70	SK-MEL-5	Malignant melanoma, metastasis to axillary node
	71	SK-MEL-24	Malignant melanoma, metastasis to node
15	72	SK-MEL-28	Malignant melanoma
	73	SK-MEL-31	Malignant melanoma
	75	Caov-3	Adenocarcinoma, ovary, consistent with primary
	76	Caov-4	Adenocarcinoma, ovary, metastasis to subserosa of fallopian tube
	77	SK-OV-3	Adenocarcinoma, ovary, malignant ascites
20	78	SW 626	Adenocarcinoma, ovary
	79	Capan-1	Adenocarcinoma, pancreas, metastasis to liver
	80	Capan-2	Adenocarcinoma, pancrease

TABLE II continued...

- 52 -

	ATTC HTB NUMBER	CELL LINE	TUMOR TYPE
	81	DU 145	Carcinoma, prostate, metastasis to brain
	82	A-204	Rhabdomyosarcoma
	85	Saos-2	Osteogenic sarcoma, primary
	86	SK-ES-1	Anaplastic osteosarcoma versus Ewing sarcoma, bone
5	88	SK-LMS-1	Leiomyosarcoma, vulva, primary
	91	SW 684	Fibrosarcoma
	92	SW 872	Liposarcoma
	93	SW 982	Axilla synovial sarcoma
	94	SW 1353	Chondrosarcoma, humerus
10	96	U-2 OS	Osteogenic sarcoma, bone primary
	102	Malme-3	Skin fibroblast
	103	KATO III	Gastric carcinoma
	104	Cate-1B	Embryonal carcinoma, testis, metastasis to lymph node
	105	Tera-1	Embryonal carcinoma, malignancy consistent with metastasis to lung
15	106	Tera-2	Embryonal carcinoma, malignancy consistent with, metastasis to lung
	107	SW579	Thyroid carcinoma
	111	AN3 CA	Endometrial adenocarcinoma, metastatic
	112	HEC-1-A	Endometrial adenocarcinoma
	113	HEC-1-B	Endometrial adenocarcinoma
20	114	SK-UT-1	Uterine, mixed mesodermal tumor, consistent with leiomyosarcoma grade III
	115	SK-UT-1B	Uterine, mixed mesodermal tumor, consistent with leiomyosarcoma grade III
	117	SW 954	Squamous cell carcinoma, vulva
	118	SW 962	Carcinoma, vulva, lymph node metastasis
	119	NCI-H69	Small cell carcinoma, lung

TABLE II continued...

- 53 -

	ATTC HTB NUMBER	CELL LINE	TUMOR TYPE
	120	NCI-H128	Small cell carcinoma, lung
	121	BT-483	Ductal carcinoma, breast
	122	BT-549	Ductal carcinoma, breast
	123	DU4475	Metastatic cutaneous nodule, breast carcinoma
5	124	HBL-100	Breast
	125	Hs 578Bst	Breast, normal
	126	Hs 578T	Ductal carcinoma, breast
	127	MDA-MB- 330	Carcinoma, breast
	128	MDA-MB- 415	Adenocarcinoma, breast
10	129	MDA-MB- 435S	Ductal carcinoma, breast
	130	MDA-MB- 436	Adenocarcinoma, breast
	131	MDA-MB- 453	Carcinoma, breast
	132	MDA-MB- 468	Adenocarcinoma, breast
	133	T-47D	Ductal carcinoma, breast, pleural effusion
15	134	Hs 766T	Carcinoma, pancreas, metastatic to lymph node
	135	Hs 746T	Carcinoma, stomach, metastatic to left leg
	137	Hs 695T	Amelanotic melanoma, metastatic to lymph node
	138	Hs 683	Glioma
	140	Hs 294T	Melanoma, metastatic to lymph node
20	142	Hs 602	Lymphoma, cervical
	144	JAR	Choriocarcinoma, placenta
	146	Hs 445	Lymphoid, Hodgkin's disease
	147	Hs 700T	Adenocarcinoma, metastatic to pelvis
	148	H4	Neuroglioma, brain

TABLE II continued...

- 54 -

	ATTC HTB NUMBER	CELL LINE	TUMOR TYPE
	151	Hs 696	Adenocarcinoma primary, unknown, metastatic to bone-sacrum
	152	Hs 913T	Fibrosarcoma, metastatic to lung
	153	Hs 729	Rhabdomyosarcoma, left leg
	157	FHs 738Lu	Lung, normal fetus
5	158	FHs 173We	Whole embryo, normal
	160	FHs 738B1	Bladder, normal fetus
	161	NIH:OVCAR -3	Ovary, adenocarcinoma
	163	Hs 67	Thymus, normal
	166	RD-ES	Ewing's sarcoma
10	168	ChaGo K-1	Bronchogenic carcinoma, subcutaneous metastasis, human
	169	WERI-Rb-1	Retinoblastoma
	171	NCI-H446	Small cell carcinoma, lung
	172	NCI-H209	Small cell carcinoma, lung
	173	NCI-H146	Small cell carcinoma, lung
15	174	NCI-H441	Papillary adenocarcinoma, lung
	175	NCI-H82	Small cell carcinoma, lung
	176	H9	T-cell lymphoma
	177	NCI-H460	Large cell carcinoma, lung
	178	NCI-H596	Adenosquamous carcinoma, lung
20	179	NCI-H676B	Adenocarcinoma, lung
	180	NCI-H345	Small cell carcinoma, lung
	181	NCI-H820	Papillary adenocarcinoma, lung
	182	NCI-H520	Squamous cell carcinoma, lung
	183	NCI-H661	Large cell carcinoma, lung
25	184	NCI-H510A	Small cell carcinoma, extra- pulmonary origin, metastatic
	185	D283 Med	Medulloblastoma
	186	Daoy	Medulloblastoma
	187	D341 Med	Medulloblastoma
	188	AML-193	Acute monocyte leukemia
30	189	MV4-11	Leukemia biphenotype

- 55 -

(a) Anti-Tumor Cell Antibodies

A straightforward means of recognizing a tumor antigen target is through the use of an antibody that has binding affinity for the particular antigen. An extensive number of antibodies are known that are directed against solid tumor antigens. Certain useful anti-tumor antibodies are listed above in Table I. However, as will be instantly known to those of skill in the art, certain of the antibodies listed in Table I will not have the appropriate biochemical properties, or may not be of sufficient tumor specificity, to be of use therapeutically. An example is MUC8-22 that recognizes a cytoplasmic antigen. Antibodies such as these will generally be of use only in investigational embodiments, such as in model systems or screening assays.

Generally speaking, antibodies for use in these aspects of the present invention will preferably recognize antigens that are accessible on the cell-surface and that are preferentially, or specifically, expressed by tumor cells. Such antibodies will also preferably exhibit properties of high affinity, such as exhibiting a K_d of <200 nM, and preferably, of <100 nM, and will not show significant reactivity with life-sustaining normal tissues, such as one or more tissues selected from heart, kidney, brain, liver, bone marrow, colon, breast, prostate, thyroid, gall bladder, lung, adrenals, muscle, nerve fibers, pancreas, skin, or other life-sustaining organ or tissue in the human body. The "life-sustaining" tissues that are the most important for the purposes of the present invention, from the standpoint of low reactivity, include heart, kidney, central and peripheral nervous system tissues and liver. The term "significant reactivity", as used herein, refers to an antibody or antibody fragment, that, when applied

- 56 -

to the particular tissue under conditions suitable for immunohistochemistry, will elicit either no staining or negligible staining with only a few positive cells scattered among a field of mostly negative cells.

5

Particularly promising antibodies from Table I contemplated for use in the present invention are those having high selectivity for the solid tumor. For example, antibodies binding to TAG 72 and the HER-2
10 proto-oncogene protein, which are selectively found on the surfaces of many breast, lung and colorectal cancers (Thor et al., 1986; Colcher et al., 1987; Shepard et al., 1991); MOv18 and OV-TL3 and antibodies that bind to the milk mucin core protein and human milk fat globule
15 (Miotti et al., 1985; Burchell et al., 1983); and the antibody 9.2.27 that binds to the high M_r melanoma antigens (Reisfeld et al., 1982). Further useful antibodies are those against the folate-binding protein, which is known to be homogeneously expressed in almost
20 all ovarian carcinomas; those against the erb family of oncogenes that are over-expressed in squamous cell carcinomas and the majority of gliomas; and other antibodies known to be the subject of ongoing pre-clinical and clinical evaluation.

25

The antibodies B3, KSI/4, CC49, 260F9, XMMCO-791, D612 and SM3 are believed to be particularly suitable for use in clinical embodiments, following the standard pre-clinical testing routinely practiced in the art. B3
30 (U.S. Patent 5,242,813; Brinkmann et al., 1991) has ATCC Accession No. HB 10573; KSI/4 can be made as described in U.S. Patent 4,975,369; and D612 (U.S. Patent 5,183,756) has ATCC Accession No. HB 9796.

35

Another means of defining a tumor-associated target is in terms of the characteristics of the tumor cell,

- 57 -

rather than describing the biochemical properties of an antigen expressed by the cell. Accordingly, the inventors contemplate that any antibody that preferentially binds to a tumor cell listed in Table II may be used as the targeting component of a bispecific ligand. The preferential tumor cell binding is again based upon the antibody exhibiting high affinity for the tumor cell and not having significant reactivity with life-sustaining normal cells or tissues, as defined above.

The invention therefore provides several means for generating an antibody for use in the targeted coagulation methods described herein. To generate a tumor cell-specific antibody, one would immunize an animal with a composition comprising a tumor cell antigen and, as described more fully herein below, select a resultant antibody with appropriate specificity. The immunizing composition may contain a purified, or partially purified, preparation of any of the antigens in Table I; a composition, such as a membrane preparation, enriched for any of the antigens in Table I; any of the cells listed in Table II; or a mixture or population of cells that include any of the cell types listed in Table II.

Of course, regardless of the source of the antibody, in the practice of the invention in human treatment, one will prefer to ensure in advance that the clinically-targeted tumor expresses the antigen ultimately selected. This is achieved by means of a fairly straightforward assay, involving antigenically testing a tumor tissue sample, for example, a surgical biopsy, or perhaps testing for circulating shed antigen. This can readily be carried out in an immunological screening assay such as an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), wherein

- 58 -

the binding affinity of antibodies from a "bank" of hybridomas are tested for reactivity against the tumor. Antibodies demonstrating appropriate tumor selectivity and affinity are then selected for the preparation of
5 bispecific antibodies of the present invention.

Due to the well-known phenomenon of cross-reactivity, it is contemplated that useful antibodies may result from immunization protocols in which the antigens
10 originally employed were derived from an animal, such as a mouse or a primate, in addition to those in which the original antigens were obtained from a human cell. Where antigens of human origin are used, they may be obtained from a human tumor cell line, or may be prepared by
15 obtaining a biological sample from a particular patient in question. Indeed, methods for the development of antibodies that are "custom-tailored" to the patient's tumor are known (Stevenson et al., 1990) and are contemplated for use in connection with this invention.

20

**(b) Further Tumor Cell Targets and Binding
Ligands**

In addition to the use of antibodies, other ligands
25 could be employed to direct a coagulating agent to a tumor site by binding to a tumor cell antigen. For tumor antigens that are over-expressed receptors (oestrogen receptor, EGF receptor), or mutant receptors, the corresponding ligands could be used as targeting agents.

30

In an analogous manner to endothelial cell receptor ligands, there may be components that are specifically, or preferentially, bound to tumor cells. For example, if a tumor antigen is an over-expressed receptor, the tumor
35 cell may be coated with a specific ligand *in vivo*. It seems that the ligand could then be targeted either with

- 59 -

an antibody against the ligand, or with a form of the receptor itself. Specific examples of these type of targeting agents are antibodies against TIE-1 or TIE-2 ligands, antibodies against platelet factor 4, and
5 leukocyte adhesion binding protein.

2. Other Disease Targets

In further embodiments, the first binding region may
10 be a component that binds to a target molecule that is specifically or preferentially expressed in a disease site other than a tumor site.

Exemplary target molecules associated with other
15 diseased cells include, for example, leukocyte adhesion molecules, that are associated with psoriasis; FGF, that is associated with proliferative diabetic retinopathy; platelet factor 4, that is associated with the activated endothelium of various diseases; and VEGF, that is
20 associated with vascular proliferative disease. It is believed that an animal or patient having any one of the above diseases would benefit from the specific induction of coagulation in the disease site.

25 Diseases that are known to have a common angio-dependent pathology, as described in Klagsburn & Folkman (1990), may also be treated with bispecific ligand as described herein. In particular, a vascular endothelial cell-targeted ligand or a stroma-targeted ligand will be
30 used to achieve coagulation in the disease site. The treatment of BPH, diabetic retinopathy, vascular restenosis, vascular adhesions, AVM, meningioma, hemangioma, neovascular glaucoma, rheumatoid arthritis and psoriasis are particularly contemplated at the
35 present time.

- 60 -

3. Disease-Associated Vasculature Cell Targets

The cells of the vasculature are intended as targets for use in the present invention. In these cases, one
5 binding region of the bispecific ligand will be capable of binding to an accessible marker preferentially expressed by disease-associated vasculature endothelial cells. The exploitation of the vascular markers is made possible due to the proximity of the vascular endothelial
10 cells to the disease area and to the products of the local aberrant physiological processes. For example, tumor vascular endothelial cells are exposed to tumor cells and tumor-derived products that change the phenotypic profile of the endothelial cells.

15 Tumor cells are known to elaborate tumor-derived products, such as lymphokines, monokines, colony-stimulating factors, growth factors and angiogenic factors, that act on the nearby vascular endothelial
20 cells (Kandel et al., 1991; Folkman, 1985a,b) and cytokines (Burrows et al., 1991; Ruco et al., 1990; Borden et al., 1990). The tumor products bind to the endothelial cells and serve to selectively induce expression of certain molecules. It is these induced
25 molecules that may be targeted using the tumor endothelium-specific coagulant delivery provided by certain aspects of the present invention. Vascular endothelial cells in tumors proliferate at a rate 30-fold greater than those in miscellaneous normal tissues
30 (Denekamp et al., 1982), suggesting that proliferation-linked determinants could also serve as markers for tumor vascular endothelial cells.

In certain embodiments of the invention, the
35 targeting component of the bispecific ligands will be a component that has a relatively high degree of

- 61 -

specificity for tumor vasculature. These targeting components may be defined as components that bind to molecules expressed on tumor endothelium, but that have little or no expression at the surface of normal
5 endothelial cells. Such specificity may be assessed by the standard procedures of immunostaining of tissue sections, which are routine to those of skill in the art.

However, as stated above, an advantage of the
10 present invention is that the requirement for selectivity is not as stringent as previously needed in the prior art methods, especially those employing immunotoxins, because any side effects associated with the mis-targeting of the coagulating agent will be minimal in comparison to those
15 resulting from the mis-targeting of a toxin.

Therefore, it is generally proposed that the molecules to be targeted using the bispecific ligands or antibodies of this invention will be those that are
20 expressed on tumor vasculature at a higher level than on normal endothelial cells.

(a) Vascular Endothelial Cell Markers in Disease

25

Molecules that are known to be preferentially expressed at the surface of vascular endothelial cells in a disease site or environment are herein termed "natural disease-associated vascular endothelial cell markers".
30 This term is used for simplicity to refer to the endothelial cell components that are expressed in diseases connected with increased or inappropriate angiogenesis or endothelial cell proliferation. One particular example are the tumor endothelial cell
35 components that are expressed *in situ* in response to

- 62 -

tumor-derived factors. These components are also termed "naturally-induced tumor endothelial cell markers".

Both VEGF/VPF (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor) and components of the FGF (fibroblast growth factor) family are concentrated in or on tumor vasculature. The corresponding receptors therefore provide a potential target for attack on tumor vasculature. For example, VEGF receptors are known to be upregulated on tumor endothelial cells, as opposed to endothelial cells in normal tissues, both in rodents and man (Thieme et al., 1995). Possibly, this is a consequence of hypoxia - a characteristic of the tumor microenvironment (Leith et al., 1992). FGF receptors are also upregulated three-fold on endothelial cells exposed to hypoxia, and so are believed to be upregulated in tumors (Bicknell and Harris et al., 1992).

The TGF β (transforming growth factor β) receptor (endoglin) on endothelial cells is upregulated on dividing cells, providing another target. One of the present inventors found that endoglin is upregulated on activated and dividing HUVEC in culture, and is strongly expressed in human tissues on endothelial cells at sites of neovascularization, including a broad range of solid tumors and fetal placenta. In contrast, endothelial cells in the majority of miscellaneous non-malignant adult tissues, including preneoplastic lesions, contain little or no endoglin. Importantly, endoglin expression is believed to correlate with neoplastic progression in the breast, as shown by benign fibroadenomas and early carcinomas binding low levels of TEC-4 and TEC-11 antibodies, and late stage intraductal carcinomas and invasive carcinomas binding high levels of these antibodies.

- 63 -

Other natural disease-associated vascular endothelial cell markers include a TIE, VCAM-1, P-selectin, E-selectin, $\alpha_v\beta_3$ integrin, pleiotropin and endosialin, each of which may be targeted using the invention.

(b) Cytokine-Inducible Vascular Endothelial Markers

Due to the nature of disease processes, which often result in localized dysfunction within the body, methods are available to manipulate the disease site whilst leaving other tissues relatively unaffected. This is particularly true in malignant and benign tumors, which exist as distinct entities within the body of an animal. For example, the tumor environment may be manipulated to create additional markers that are specific for tumor vascular endothelial cells. These methods generally mimic those that occur naturally in solid tumors, and also involve the local production of signalling agents, such as growth factors or cytokines, that induce the specific expression of certain molecules at the surface of the nearby vascular endothelial cells.

The group of molecules that may be artificially induced to be expressed at the surface of vascular endothelial cells in a disease or tumor environment are herein termed "inducible endothelial cell markers", or specifically, inducible tumor endothelial cell markers. This term is used to refer to those markers that are artificially induced, i.e., induced as a result of manipulation by the hand of man, rather than those that are induced as part of the disease or tumor development process in an animal. The term "inducible marker", as defined above, is chosen for simple reference in the context of the present application, notwithstanding the

- 64 -

fact that "natural markers" are also induced, e.g., by tumor-derived agents.

Thus, although not required to practice the invention, techniques for the selective elicitation of vascular endothelial antigen targets on the surface of disease-associated vasculature are available that may, if desired, be used in conjunction with the invention. These techniques involve manipulating the antigenic expression, or cell surface presentation, such that a target antigen is expressed or rendered available on the surface of disease-associated vasculature and not expressed or otherwise rendered accessible or available for binding, or at least to a lesser extent, on the surface of normal endothelium.

Tumor endothelial markers can be induced by tumor-derived cytokines (Burrows *et al.*, 1991; Ruco *et al.*, 1990) and by angiogenic factors (Mignatti *et al.*, 1991). Examples of cell surface markers that may be specifically induced in the tumor endothelium and then targeted using a bispecific coagulating ligand, as provided by the invention, include those listed in Table III (Bevilacqua *et al.*, 1987; Dustin *et al.*, 1986; Osborn *et al.*, 1989; Collins *et al.*, 1984).

The mechanisms for the induction of the proposed markers; the inducing, or "intermediate cytokine", such as IL-1 and IFN- γ ; and the leukocyte cell type and associated cytokine-activating molecule, whose targeting will result in the release of the cytokine, are also set forth in Table III. In the induction of a specific marker, a bispecific "cytokine-inducing" or "antigen-inducing" antibody is generally required. This antibody will selectively induce the release of the appropriate cytokine in the locale of the tumor, thus selectively

- 65 -

inducing the expression of the desired target antigen by the vascular endothelial cells. The bispecific antibody cross-links cells of the tumor mass and cytokine-producing leukocytes, thereby activating the leukocytes to release the cytokine.

The preparation and use of bispecific antibodies such as these is predicated in part on the fact that cross-linking antibodies recognizing CD3, CD14, CD16 and CD28 have previously been shown to elicit cytokine production selectively upon cross-linking with the second antigen (Qian et al., 1991). In the context of the present invention, since only successfully tumor cell-crosslinked leukocytes will be activated to release the cytokine, cytokine release will be restricted to the locale of the tumor. Thus, expression of the desired marker, such as E-selectin, will be similarly limited to the endothelium of the tumor vasculature.

TABLE III
POSSIBLE INDUCIBLE VASCULAR TARGETS

INDUCIBLE ENDOTHELIAL CELL MOLECULES	ACRONYM	SUBTYPES/ALIASES (MOLECULAR FAMILY)	INDUCING CYTOKINES	LEUKOCYTES WHICH PRODUCE THOSE CYTOKINES	LEUKOCYTE MOLECULES WHICH, WHEN CROSSLINKED BY MONOCLONAL ANTIBODIES ACTIVATE THE CELLS TO PRODUCE CYTOKINES
Endothelial- Leukocyte Adhesion Molecule-1	ELAM-1	-- (Selectin)	IL-1, TNF- α , (TNF- β) (Bacterial Endotoxin)	monocytes	CD14
	E-select-in			macrophages	CD14
				mast cells	FcR for IgE
Vascular Cell Adhesion Molecule-1	VCAM-1	Inducible Cell Adhesion Molecule-110 (INCAM- 110) (Immunoglobulin Family)	(Bacterial Endotoxin) IL-1, TNF- α	monocytes	CD14
				macrophages	CD14
				mast cells	FcR for IgE
			TNF- β , IL-4	helper T cells	CD2, CD3, CD28
			TNF	NK cells	FcR for IgG (CD16)

TABLE III continued...

INDUCIBLE ENDOTHELIAL CELL MOLECULES	ACRONYM	SUBTYPES/ALIASES (MOLECULAR FAMILY)	INDUCING CYTOKINES	LEUKOCYTES WHICH PRODUCE THOSE CYTOKINES	LEUKOCYTE MOLECULES WHICH, WHEN CROSSLINKED BY MONOCLONAL ANTIBODIES ACTIVATE THE CELLS TO PRODUCE CYTOKINES
Intercellular Adhesion Molecule-1	ICAM-1	.. (Immunoglobulin Family)	IL-1, TNF α (Bacterial Endotoxin)	monocytes	CD14
				macrophages	CD15
				mast cells	FcR for IgE
			TNF- β , IFN γ	T helper cells	CD2, CD3, CD28
The Agent for Leukocyte Adhesion Molecule-1	LAM-1 Agent	MEL-14 Agent (Mouse)	IL-1, TNF α (Bacterial Endotoxin)	NK cells	FcR for IgG (CD16)
				monocytes	CD14
				macrophages	CD14
			IFN- γ	mast cells	FcR for IgE
Major Histocompatibility Complex Class II Antigen	MHC Class II	HLA-DR HLA-DP HLA-DQ	IFN- γ	helper T cells	CD2, CD3, CD28
		I-A I-E		NK cells	FcR for IgG (CD16)

- 68 -

It is important to note that, from the possible inducible markers listed in Table III, E-selectin and MHC Class II antigens, such as HLA-DR, HLA-DP and HLA-DQ (Collins et al., 1984), are by far the most preferred targets for use in connection with clinical embodiments. The other adhesion molecules of Table III appear to be expressed to varying degrees in normal tissues, generally in lymphoid organs and on endothelium, making their targeting perhaps appropriate only in animal models or in cases where their expression on normal tissues can be inhibited without significant side-effects. The targeting of E-selectin or an MHC Class II antigen is preferred as the expression of these antigens will likely be the most direct to promote selectively in tumor-associated endothelium.

E-selectin

The targeting of an antigen that is not expressed on the surfaces of normal endothelium is the most straightforward form of the induction methods. E-selectin is an adhesion molecule that is not expressed in normal endothelial vasculature or other human cell types (Cotran et al., 1986), but can be induced on the surface of endothelial cells through the action of cytokines such as IL-1, TNF, lymphotoxin and bacterial endotoxin (Bevilacqua et al., 1987). It is not induced by IFN- γ (Wu et al., 1990). The expression of E-selectin may thus be selectively induced in tumor endothelium through the selective delivery of such a cytokine, or via the use of a composition that causes the selective release of such cytokines in the tumor environment.

Bispecific antibodies are one example of a composition capable of causing the selective release of one or more of the foregoing or other appropriate

- 69 -

cytokines in the tumor site, but not elsewhere in the body. Such bispecific antibodies are herein termed "antigen-inducing antibodies" and are, of course, distinct from any bispecific antibodies of the invention that have targeting and coagulating components. Antigen-inducing antibodies are designed to cross-link cytokine effector cells, such as cells of monocyte/macrophage lineage, T cells and/or NK cells or mast cells, with tumor cells of the targeted solid tumor mass. This cross-linking would then effect a release of cytokine that is localized to the site of cross-linking, i.e., the tumor.

Effective antigen-inducing antibodies recognize a selected tumor cell surface antigen on the one hand (e.g., those in Table I) and, on the other hand, recognize a selected "cytokine activating" antigen on the surface of a selected leukocyte cell type. The term "cytokine activating" antigen is used to refer to any one of the various known molecules on the surfaces of leukocytes that, when bound by an effector molecule, such as an antibody or a fragment thereof or a naturally-occurring agent or synthetic analog thereof, be it a soluble factor or membrane-bound counter-receptor on another cell, promotes the release of a cytokine by the leukocyte cell. Examples of cytokine activating molecules include CD14 (the LPS receptor) and FcR for IgE, which will activate the release of IL-1 and TNF α ; and CD16, CD2 or CD3 or CD28, which will activate the release of IFN γ and TNF β , respectively.

Once introduced into the bloodstream of an animal bearing a tumor, such an antigen-inducing bispecific antibody will bind to tumor cells within the tumor, cross-link those tumor cells with effector cells, e.g., monocytes/macrophages, that have infiltrated the tumor,

- 70 -

and thereafter effect the selective release of cytokine within the tumor. Importantly, however, without cross-linking of the tumor and leukocyte, the antigen-inducing antibody will not effect the release of cytokine. Thus,
5 no cytokine release will occur in parts of the body removed from the tumor and, hence, expression of cytokine-induced molecules, e.g., E-selectin, will occur only within the tumor endothelium.

10 A number of useful "cytokine activating" antigens are known, which, when cross-linked with an appropriate bispecific antibody, will result in the release of cytokines by the cross-linked leukocyte. The generally preferred target for this purpose is CD14, which is found
15 on the surface of monocytes and macrophages. When CD14 is cross linked it stimulates monocytes/ macrophages to release IL-1 (Schutt et al., 1988; Chen et al., 1990), and possibly other cytokines, which, in turn stimulate the appearance of E-selectin on nearby vasculature.
20 Other possible targets for cross-linking in connection with E-selectin induction and targeting include FcR for IgE, found on Mast cells; FcR for IgG (CD16), found on NK cells; as well as CD2, CD3 or CD28, found on the surfaces of T cells. Of these, CD14 targeting is generally
25 preferred due to the relative prevalence of monocyte/ macrophage infiltration of solid tumors as opposed to the other leukocyte cell types.

In an exemplary induction embodiment, an animal
30 bearing a solid tumor is injected with bispecific (Fab'-Fab') anti-CD14/anti-tumor antibody (such as anti-CEA, 9.2.27 antibody against high Mr melanoma antigens OV-TL3 or MOV 18 antibodies against ovarian associated antigens). The antibody localizes in the tumor, by
35 virtue of its tumor binding activity, and then activates monocytes and macrophages in the tumor by crosslinking

- 71 -

their CD14 antigens (Schutt et. al., 1988; Chen et. al., 1990). The activated monocytes/macrophages have tumoricidal activity (Palleroni et. al., 1991) and release IL-1 and TNF which rapidly induce E-selectin antigens on the tumor vascular endothelial cells (Bevilacqua et. al., 1987; Pober et. al., 1991).

MHC Class II Antigens

The second preferred group of inducible markers contemplated for use with the present invention are the MHC Class II antigens (Collins et al., 1984), including HLA-DR, HLA-DP and HLA-DQ. Class II antigens are expressed on vascular endothelial cells in most normal tissues in several species, including man. Studies in vitro (Collins et al., 1984; Daar et al., 1984; O'Connell et al., 1990) and in vivo (Groenewegen et al., 1985) have shown that the expression of Class II antigens by vascular endothelial cells requires the continuous presence of IFN- γ which is elaborated by T_{H1} cells and, to a lesser extent, by NK cells and CD8⁺ T cells.

MHC Class II antigens are not unique to vascular endothelial cells, and are also expressed constitutively on B cells, activated T cells, cells of monocyte/macrophage lineage and on certain epithelial cells, both in mice (Hammerling, 1976) and in man (Daar et al., 1984). Due to the expression of MHC Class II antigens on "normal" endothelium, their targeting is not quite so straightforward as E-selectin. However, the induction and targeting of MHC Class II antigens is made possible by using in conjunction with an immunosuppressant, such as Cyclosporin A (CsA), that has the ability to effectively inhibit the expression of Class II molecules in normal tissues (Groenewegen et al., 1985). The CsA acts by preventing the activation of

- 72 -

T cells and NK cells (Groenewegen et al., 1985; DeFranco, 1991), thereby reducing the basal levels of IFN- γ below those needed to maintain Class II expression on endothelium.

5

There are various other cyclosporins related to CsA, including cyclosporins A, B, C, D, G, and the like, that also have immunosuppressive action and are likely to demonstrate an ability to suppress Class II expression.

10 Other agents that might be similarly useful include FK506 and rapamycin.

Thus, the practice of the MHC Class II induction and targeting embodiment requires a pretreatment of the

15 tumor-bearing animal with a dose of CsA or other Class II immunosuppressive agent that is effective to suppress Class II expression. In the case of CsA, this will typically be on the order of about 10 to about 30 mg/kg body weight. Once suppressed in normal tissues, Class II

20 antigens can then be selectively induced in the tumor endothelium, again through the use of a bispecific antibody.

In this case, the antigen-inducing bispecific

25 antibody will have specificity for a tumor cell marker and for an activating antigen found on the surface of an effector cell that is capable of inducing IFN- γ production. Such effector cells will generally be helper T cells (T_H) or Natural Killer (NK) cells. In these

30 embodiments, it is necessary that T cells, or NK cells if CD16 is used, be present in the tumor to produce the cytokine intermediate in that Class II antigen expression is achieved using IFN- γ , but is not achieved with the other cytokines. Thus, for the practice of this aspect

35 of the invention, one will desire to select CD2, CD3, CD28, or most preferably CD28, as the cytokine activating

- 73 -

antigen for targeting by the antigen-inducing bispecific antibody.

5 The T cells that should be activated in the tumor are those adjacent to the vasculature since this is the region most accessible to cells and is also where the bispecific antibody will be most concentrated. The activated T cells should then secrete IFN- γ which induces Class II antigens on the adjacent tumor vasculature.

10

The use of a bispecific (Fab'-Fab') antibody having one arm directed against a tumor antigen and the other arm directed against CD28 is currently preferred. This antibody will crosslink CD28 antigens on T cells in the tumor which, when combined with a second signal (provided, for example, by IL-1 which is commonly secreted by tumor cells (Burrows et al., 1991; Ruco et al., 1990), has been shown to activate T cells through a CA^{2+} -independent non-CsA-inhibitable pathway (Hess et al., 1991; June et al., 1987; Bjorndahl et al., 1989).

25 The preparation of antibodies against various cytokine activating molecules is also well known in the art. For example, the preparation and use of anti-CD14 and anti-CD28 monoclonal antibodies having the ability to induce cytokine production by leukocytes has now been described by several laboratories (reviewed in Schutt et al., 1988; Chen et al., 1990, and June et al., 1990, respectively). Moreover, the preparation of monoclonal antibodies that will stimulate leukocyte release of cytokines through other mechanisms and other activating antigens is also known (Clark et al., 1986; Geppert et al., 1990).

35 In still further embodiments, the inventors contemplate an alternative approach for suppressing the

- 74 -

expression of Class II molecules, and selectively eliciting Class II molecule expression in the locale of the tumor. This approach, which avoids the use of both CsA and a bispecific activating antibody, takes advantage of the fact that the expression of Class II molecules can be effectively inhibited by suppressing IFN- γ production by T cells, e.g., through use of an anti-CD4 antibody (Street et al., 1989). Using this embodiment, IFN- γ production is inhibited by administering anti-CD4, resulting in the general suppression of Class II expression. Class II is then induced only in the tumor site, e.g., using tumor-specific T cells which are only activatable within the tumor.

In this mode of treatment, one will generally pretreat an animal or human patient with a dose of anti-CD4 that is effective to suppress IFN- γ production and thereby suppress the expression of Class II molecules. Effective doses are contemplated to be, for example, on the order of about 4 to about 10 mg/kg body weight. After Class II expression is suppressed, one will then prepare and introduce into the bloodstream an IFN- γ -producing T cell clone (e.g., T_H1 or cytotoxic T lymphocyte, CTL) specific for an antigen expressed on the surface of the tumor cells. These T cells localizes to the tumor mass, due to their antigen recognition capability and, upon such recognition, then release IFN- γ . In this manner, cytokine release is again restricted to the tumor, thus limiting the expression of Class II molecules to the tumor vasculature.

The IFN- γ -producing T cell clone may be obtained from the peripheral blood (Mazzocchi et al., 1990), however, a preferred source is from within the tumor mass (Fox et al., 1990). The currently preferred means of preparing such a T cell clone is to remove a portion of

- 75 -

the tumor mass from a patient; isolate cells, using collagenase digestion, where necessary; enrich for tumor infiltrating leukocytes using density gradient centrifugation, followed by depletion of other leukocyte subsets by, e.g., treatment with specific antibodies and complement; and then expand the tumor infiltrating leukocytes *in vitro* to provide the IFN- γ producing clone. This clone will necessarily be immunologically compatible with the patient, and therefore should be well tolerated by the patient.

It is proposed that particular benefits will be achieved by further selecting a high IFN- γ producing T cell clone from the expanded leukocytes by determining the cytokine secretion pattern of each individual clone every 14 days. To this end, rested clones will be mitogenically or antigenically-stimulated for about 24 hours and their culture supernatants assayed, e.g., using a specific sandwich ELISA technique (Cherwinski et al., 1989), for the presence of IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5 and IL-10. Those clones secreting high levels of IL-2 and IFN- γ , the characteristic cytokine secretion pattern of T_H1 clones, will be selected. Tumor specificity will be confirmed using proliferation assays.

Furthermore, one will prefer to employ as the anti-CD4 antibody an anti-CD4 Fab, because it will be eliminated from the body within 24 hours after injection and so will not cause suppression of the tumor-recognizing T-cell clones that are subsequently administered. The preparation of T cell clones having tumor specificity is generally known in the art, as exemplified by the production and characterization of T cell clones from lymphocytes infiltrating solid melanoma tumors (Maeda et al., 1991).

- 76 -

In using either of the MHC Class II suppression-induction methods, additional benefits will likely result from the fact that anti-Class II antibodies injected intravenously do not appear to reach the epithelial cells or the monocytes/macrophages in normal organs other than the liver and spleen. Presumably this is because the vascular endothelium in most normal organs is tight, not fenestrated as it is in the liver and spleen, and so the antibodies must diffuse across basement membranes to reach the Class II-positive cells. Also, any B cell elimination that may result, e.g., following cross-linking, is unlikely to pose a significant problem as these cells are replenished from Class II negative progenitors (Lowe et al., 1986). Even B cell killing, as occurs in B lymphoma patients, causes no obvious harm (Vitetta et al., 1991).

In summary, although the tumor coagulating compositions and antibodies of the present invention are elegantly simple, and do not require the induction of antigens for their operability, the combined use of an antigen-inducing bispecific antibody with this invention is also contemplated. Such antibodies would generally be administered prior to the bispecific coagulating ligands of this invention.

Generally speaking, the more "immunogenic" tumors would be more suitable for the MHC Class II approach involving, e.g., the cross-linking of T cells in the tumor through an anti-CD28/anti-tumor bispecific antibody, because these tumors are more likely to be infiltrated by T cells, a prerequisite for this method to be effective. Examples of immunogenic solid tumors include renal carcinomas, melanomas, a minority of breast and colon cancers, as well as possibly pancreatic, gastric, liver, lung and glial tumor cancers. These

- 77 -

tumors are referred to as "immunogenic" because there is evidence that they elicit immune responses in the host and they have been found to be amenable to cellular immunotherapy (Yamaue et al., 1990). In the case of
5 melanomas and large bowel cancers, the most preferred antibodies for use in these instances would be B72.3 (anti-TAG-72) and PRSC5/PR4C2 (anti-Lewis a) or 9.2.27 (anti-high Mr melanoma antigen).

10 For the majority of solid tumors of all origins, an anti-CD14 approach that employs a macrophage/monocyte intermediate would be more suitable. This is because most tumors are rich in macrophages. Examples of
15 macrophage-rich tumors include most breast, colon and lung carcinomas. Examples of preferred anti-tumor antibodies for use in these instances would be anti-HER-2, B72.3, SM-3, HMFG-2, and SWA11 (Smith et al., 1989).

(c) Coagulant-Inducible Markers

20 Coagulants, such as thrombin, Factor IX/IXa, Factor X/Xa, plasmin and metalloproteinases, such as interstitial collagenases, stromelysins and gelatinases, also act to induce certain markers. In particular,
25 E-selectin, P-selectin, PDGF and ICAM-1 are induced by thrombin (Sugama et. al., 1992; Shankar et. al., 1994).

Therefore, for this induction, an anti-coagulant/anti-tumor bispecific antibody will be
30 utilized. The antibody will localize in the tumor via its tumor binding activity. The bispecific will then concentrate the coagulant, e.g., thrombin, in the tumor, resulting in induction of E-selectin and P-selectin on the tumor vascular endothelial cells (Sugama et. al.,
35 1991; Shankar et. al., 1994).

- 78 -

Alternatively, targeting of truncated tissue factor to tumor cells or endothelium will induce thrombin deposition within the tumor. As the thrombin is deposited, E-selectin and P-selectin will be induced on the tumor vascular endothelial cells.

(d) Antibodies to Vascular Endothelial Cell Markers

10 A straightforward means of recognizing a disease-associated vasculature target, whether induced in the natural environment or by artificial means, is through the use of an antibody that has binding affinity for the particular cell surface receptor, molecule or antigen.

15 These include antibodies directed against all cell surface components that are known to be present on, e.g., tumor vascular endothelial cells, those that are induced or over-expressed in response to tumor-derived factors, and those that are induced following manipulation by the

20 hand of man. Table IV and Table V summarize useful antibodies and their properties.

TABLE IV
SUMMARY OF VASCULATURE STAINING PATTERNS
OF CERTAIN ANTIBODIES TO HUMAN TUMOR VASCULATURE

Antibody	Antigen	Reference	% Tumor types stained	% tumor vessels stained	normal vessel reactivity
anti-vWF	VIII R Ag		100	100	strong on all
FB5	endosialin	Rettig & old	30	10-20	lymphoid organs
TP3	80 kDa osteosarcoma related antigen protein	Bruland	50	10-30	strong on small BV
BC-1	fibronectin isoform	Zardi	60	10-30	none
TV-1	fibronectin	Epstein	100	100	strong on all
LM 609	$\alpha_v\beta_e$ vitronectin receptor	Cheneoh	85	70-80	medium on all
TEC 11	endoglin	Thorpe; _	100	100	weak on most
TEC 110	VEGF	Thorpe; _	100	100	weak on most

5

10

TABLE V
COMPARISON OF ANTI-EC mAbs
ON HUMAN TUMORS

TUMOR TYPE	n	TEC 110	TEC 11	FB-5	TP-3	BC-1	TV-1	LM 609
DIGESTIVE								
Gastrointestinal	9	++	++	+-	++	+	++	++
Parotid	3	++	++	-	++ (SMALL)	-	ND	ND
REPRODUCTIVE								
Breast	1	+	++	-	ND	++	++	-
Ovary	4	++	++	-	++ (SMALL)	++	++	+
Uterus	2	++	++	-		++	++	+
RESPIRATORY								
Lung	3	++	++	+	ND	++	++	+
LYMPHOID								
Hodgkins	2	++	++	-	+	-	++	+

5

10

15

20

- 81 -

Two further antibodies that may be used in this invention are those described by Rettig et al. (1992) and Wang et al. (1993) that are directed against unrelated antigens of unknown function expressed in the vasculature of human tumors, but not in most normal tissues.

The antibody described by Kim et. al. (1993) may also be used in this invention, particularly as this antibody inhibited angiogenesis and suppressed tumor growth *in vivo*.

Antibodies that have not previously been shown to be specific for human tumors may also be used. For example, Venkateswaran et al. (1992) described the production of anti-FGF MAbs. Xu et. al. (1992) developed and characterized a panel of 16 isoform and domain-specific polyclonal and monoclonal antibodies against FGF receptor (flg) isoforms. Massoglia et al. (1987) also reported MAbs against FGF.

(e) Generation of Antibodies to Disease Vasculature

In addition to utilizing a known antibody, such as those described above and others known and published in the scientific literature, one may also generate a novel antibody using standard immunization procedures, as described in more detail hereinbelow. To generate an antibody against a known disease-associated vascular marker antigen, one would immunize an animal with an immunogenic composition comprising the antigen. This may be a membrane preparation that includes, or is enriched for, the antigen; a relatively purified form of the antigen, as isolated from cells or membranes; a highly purified form of the antigen, as obtained by a variety of purification steps using, e.g., a native antigen extract

- 82 -

or a recombinant form of the antigen obtained from a recombinant host cell.

The present invention also provides yet further methods for generating an antibody against an antigen present on disease-associated vasculature endothelial cells, which methods are suitable for use even where the biochemical identity of the antigen remains unknown. These methods are exemplified through the generation of an antibody against tumor vasculature endothelial cells. A first means of achieving antibody generation in this manner uses a preparation of vascular endothelial cells obtained from the tumor site of an animal or human patient. One simply immunizes an experimental animal with a preparation of such cells and collects the antibodies so produced. The most useful form of this method is that where specific antibodies are subsequently selected, as may be achieved using conventional hybridoma technology and screening against tumor vascular endothelial cells.

A development of the above method is that which mimics the tumor vasculature phenomenon *in vitro*, and where cell purification is not necessary. In using this method, endothelial cells are subjected to tumor-derived products, such as might be obtained from tumor-conditioned media, in cell culture rather than in an animal. This method generally involves stimulating endothelial cells with tumor-conditioned medium and employing the stimulated endothelial cells as immunogens to prepare a collection of antibodies. Again, specific antibodies should be selected, e.g., using conventional monoclonal antibody technology, or other techniques such as combinatorial immunoglobulin phagemid libraries prepared from RNA isolated from the spleen of the immunized animal. One would select a specific antibody

- 83 -

that preferentially recognizes tumor-stimulated vascular endothelium and reacts more strongly with tumor-associated endothelial cells than with normal adult human tissues.

5

Stimulated endothelial cells contemplated to be of use in this regard include, for example, human umbilical vein endothelial cells (HUVE), human dermal microvascular endothelial cells (HDEMC), human saphenous vein
10 endothelial cells, human omental fat endothelial cells, other human microvascular endothelial cells, human brain capillary endothelial cells, and the like. It is also contemplated that endothelial cells from another species may stimulated by tumor-conditioned media and employed as
15 immunogens to generate hybridomas to produce an antibodies in accordance herewith, i.e., to produce antibodies that crossreact with tumor-stimulated human vascular endothelial cells, and/or antibodies for use in pre-clinical models.

20

"Tumor-conditioned medium or media" are defined herein as compositions or media, such as culture media, that contain one or more tumor-derived cytokines, lymphokines or other effector molecules. Most typically,
25 tumor-conditioned medium is prepared from a culture medium in which selected tumor cells have been grown, and will therefore be enriched in such tumor-derived products. The type of medium is not believed to be particularly important, so long as it at least initially
30 contains appropriate nutrients and conditions to support tumor cell growth. It is also, of course, possible to extract and even separate materials from tumor-conditioned media and employ one or more of the extracted products for application to the endothelial cells.

35

- 84 -

As for the type of tumor used for the preparation of the medium or media, one will, of course, prefer to employ tumors that mimic or resemble the tumor that will ultimately be subject to analysis or treatment using the present invention. Thus, for example, where one envisions the development of a protocol for the treatment of breast cancer, one will desire to employ breast cancer cells such as ZR-75-1, T47D, SKBR3, MDA-MB-231. In the case of colorectal tumors, one may mention by way of example the HT29 carcinoma, as well as DLD-1, HCT116 or even SW48 or SW122. In the case of lung tumors, one may mention by way of example NCI-H69, SW2, NCI H23, NCI H460, NCI H69, or NCI H82. In the case of melanoma, good examples are DX.3, A375, SKMEL-23, HMB-2, MJM, T8 or indeed VUP. In any of the above cases, it is further believed that one may even employ cells produced from the tumor that is to be treated, i.e., cells obtained from a biopsy.

Once prepared, the tumor-conditioned media is then employed to stimulate the appearance of tumor endothelium-specific marker(s) on the cell surfaces of endothelial cells, e.g., by culturing selected endothelial cells in the presence of the tumor-conditioned media (or products derived therefrom). Again, it is proposed that the type of endothelial cell that is employed is not of critical importance, so long as it is generally representative of the endothelium associated with the vasculature of the particular tumor that is ultimately to be treated or diagnosed. The inventors prefer to employ human umbilical vein endothelial cells (HUVE), or human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC, Karasek, 1989), in that these cells are of human origin, respond to cytokine growth factors and angiogenic factors and are readily obtainable. However, it is proposed that any endothelial

- 85 -

cell that is capable of being cultured *in vitro* may be employed in the practice of the invention and nevertheless achieve beneficial results. One may mention, by way of example, cells such as EA.hy9.26,
5 ECV304, human saphenous vein endothelial cells, and the like.

Once stimulated using the tumor-derived products, the endothelial cells are then employed as immunogens in
10 the preparation of monoclonal antibodies (MAbs). The technique for preparing MAbs against antigenic cell surface markers is quite straightforward, and may be readily carried out using techniques well known to those of skill in the art, as exemplified by the technique of
15 Kohler & Milstein (1975), and further described hereinbelow.

Generally speaking, a preferred method of preparing MAbs using stimulated endothelial cells involves the
20 following procedures: Cells or cell lines derived from human tumors are grown in tissue culture for ≥ 4 days. The tissue culture supernatant ('tumor-conditioned medium') is removed from the tumor cell cultures and added to cultures of HUVEC at a final concentration of
25 50% (v/v). After 2 days culture the HUVEC are harvested non-enzymatically and $1-2 \times 10^6$ cells injected intraperitoneally into mice. This process is repeated three times at two-weekly intervals, the final immunization being by the intravenous route. Three days
30 later the spleen cells are harvested and fused with SP2/0 myeloma cells by standard protocols (Kohler & Milstein, 1975) and hybridomas producing antibodies with the appropriate reactivity are cloned by limiting dilution.

35 From the resultant collection of hybridomas, one will then desire to select one of more hybridomas that

- 86 -

produce an antibody that recognizes the activated vascular endothelium to a greater extent than it recognizes non-activated vascular endothelium. One goal is the identification of antibodies having virtually no binding affinity for normal endothelium. However, in contrast to the prior art, in the present invention this property is not critical. In any event, one will generally identify suitable antibody-producing hybridomas by screening using, e.g., an ELISA, RIA, IRMA, IIF, or similar immunoassay, against one or more types of tumor-activated endothelial cells. Once candidates have been identified, one will desire to test for the absence of reactivity for non-activated or "normal" endothelium or other normal tissue or cell type. In this manner, hybridomas producing antibodies having an undesirably high level of normal cross-reactivity for the particular application envisioned may be excluded.

(f) Anti-Endoglin Antibodies

Using the technique described above, antibodies having relative specificity for tumor vascular endothelium have been prepared and isolated. In one particular example, HT29 carcinoma cells were employed to prepare the conditioned medium, which was then employed to stimulate HUVE cells in culture. The resultant HT29-activated HUVE cells were then employed as immunogens in the preparation of a hybridoma bank, which was ELISA-screened using HT29-activated HUVE cells and by immunohistologic analysis of sections of human tumors and normal tissues. From this bank, antibodies that recognized a tumor vascular endothelial cell antigen were selected.

The MAbs termed tumor endothelial cell antibody 4 and tumor endothelial cell antibody 11 (TEC4 and TEC11)

- 87 -

were obtained using the above method. The antigen recognized by TEC4 and TEC11 was ultimately determined to be the molecule endoglin. The epitopes on endoglin recognized by TEC4 and TEC11 are present on the cell surface of stimulated HUVE cells, and only minimally present (or immunologically accessible) on the surface of non-stimulated cells. MAbs have previously been raised against endoglin. However, analyzing the reactivity with HUVEC or TCM-activated HUVEC cell surface determinants by FACS or indirect immunofluorescence shows the epitopes recognized by TEC-4 and TEC-11 to be distinct from those of a previous antibody termed 44G4 (Gougos & Letarte, 1988).

Although any of the known anti-endoglin antibodies (e.g., Gougos & Letarte, 1988; Gougos et al., 1992; O'Connell et al., 1992; Bühring et al., 1991) may be used in connection with the present invention, the TEC-4 and TEC-11 mAbs are envisioned to be particularly suitable. This is because they label capillary and venular endothelial cells moderately to strongly in a broad range of solid tumors (and in several chronic inflammatory conditions and fetal placenta), but display relatively weak staining of vessels in the majority of normal, healthy adult tissues. TEC-11 is particularly preferred as it shows virtually no reactivity with non-endothelial cells. Furthermore, both TEC-4 and TEC-11 are complement-fixing, which imparts to them the potential to also induce selective lysis of endothelial cells in the tumor vascular bed.

Antibodies that are cross-reactive with the MAbs TEC-4 and TEC-11, i.e., those that bind to endoglin at the same epitope as TEC-4 or TEC-11, are also contemplated to be of use in this invention. The identification of an antibody or antibodies that bind to

- 88 -

endoglin at the same epitopes as TEC-4 or TEC-11 is a fairly straightforward matter. This can be readily determined using any one of variety of immunological screening assays in which antibody competition can be assessed. For example, where the test antibodies to be examined are obtained from a different source to that of TEC-4 or TEC-11, e.g., a rabbit, or are even of a different isotype, for example, IgG1 or IgG3, a competition ELISA may be employed. In one such embodiment of a competition ELISA one would pre-mix TEC-4 or TEC-11 with varying amounts of the test antibodies prior to applying to the antigen-coated wells in the ELISA plate. By using either anti-murine or anti-IgM secondary antibodies one will be able to detect only the bound TEC-4 or TEC-11 antibodies - the binding of which will be reduced by the presence of a test antibody that recognizes the same epitope as either TEC-4 or TEC-11.

To conduct an antibody competition study between TEC-4 or TEC-11 and any test antibody, one may first label TEC-4 or TEC-11 with a detectable label, such as, e.g., biotin or an enzymatic or radioactive label, to enable subsequent identification. In these cases, one would incubate the labelled antibodies with the test antibodies to be examined at various ratios (e.g., 1:1, 1:10 and 1:100) and, after a suitable period of time, one would then assay the reactivity of the labelled TEC-4 or TEC-11 antibodies and compare this with a control value in which no potentially competing antibody (test) was included in the incubation.

The assay may be any one of a range of immunological assays based upon antibody binding and the TEC-4 or TEC-11 antibodies would be detected by means of detecting their label, e.g., using streptavidin in the case of biotinylated antibodies or by using a chromogenic

- 89 -

substrate in connection with an enzymatic label or by simply detecting the radiolabel. An antibody that binds to the same epitope as TEC-4 or TEC-11 will be able to effectively compete for binding and thus will

5 significantly reduce TEC-4 or TEC-11 binding, as evidenced by a reduction in labelled antibody binding. In the present case, after mixing the labelled TEC-4 or TEC-11 antibodies with the test antibodies, suitable assays to determine the remaining reactivity include,

10 e.g., ELISAs, RIAs or western blots using human endoglin; immunoprecipitation of endoglin; ELISAs, RIAs or immunofluorescent staining of recombinant cells expressing human endoglin; indirect immunofluorescent staining of tumor vasculature endothelial cells;

15 reactivity with HUVEC or TCM-activated HUVEC cell surface determinants indirect immunofluorescence and FACS analysis. This latter method is most preferred and was employed to show that the epitopes recognized by TEC-4 and TEC-11 are distinct from that of 44G4 (Gougos &

20 Letarte, 1988).

The reactivity of the labelled TEC-4 or TEC-11 antibodies in the absence of any test antibody is the control high value. The control low value is obtained by

25 incubating the labelled antibodies with unlabelled antibodies of the same type, when competition would occur and reduce binding of the labelled antibodies. A significant reduction in labelled antibody reactivity in the presence of a test antibody is indicative of a test

30 antibody that recognizes the same epitope, i.e., one that "cross-reacts" with the labelled antibody. A "significant reduction" in this aspect of the present application may be defined as a reproducible (i.e., consistently observed) reduction in binding of at least

35 about 10%-50% at a ratio of about 1:1, or more

- 90 -

preferably, of equal to or greater than about 90% at a ratio of about 1:100.

5 The use of "cross-reactivity assays", as described above in the context of TEC-4 and TEC-11 antibodies, may be applied to any antibody for use in the present invention. Therefore, antibodies that bind to a component of a tumor cell, a component of tumor vasculature, a tumor cell-associated component, a tumor
10 vasculature-associated component, a tumor extracellular matrix component, or to any cell type listed herein, at the same epitope as any of the antibodies listed herein, as determined by an antibody competition assay, will be an antibody that falls under the scope of this invention
15 when combined with a coagulating agent to form a bispecific ligand.

(g) Use of Vascular Endothelial Cell Binding
Ligands

20

Biological ligands that are known to bind or interact with endothelial cell surface molecules, such as growth factor receptors, may also be employed as a targeting component.

25

The growth factors or ligands contemplated to be useful as targets in this sense include VEGF/VPF, FGF, TGF β , ligands that bind to a TIE, tumor-associated fibronectin isoforms, scatter factor, hepatocyte growth
30 factor (HGF), platelet factor 4 (PF4), PDGF and TIMP.

Particularly preferred targets are VEGF/VPF, the FGF family of proteins and TGF β . Abraham et al. (1986) cloned FGF, which is therefore available as a recombinant
35 protein. As reported by Ferrara et al. (1991), four

- 91 -

species of VEGF having 121, 165, 189, and 206 amino acids have been cloned.

(h) Targeting of Bound Ligands

5

Antibodies or specific targeting ligands may also be directed to any component that binds to the surface of vascular endothelial cells in a disease site, such as a tumor. Such components are exemplified by tumor-derived
10 ligands and antigens, such as growth factors, that bind to specific cell surface receptors already present on the endothelial cells, or to receptors that have been induced, or over-expressed, on such cells in response to the tumor environment. Tumor vasculature-associated
15 targets may also be termed tumor-derived endothelial cell binding factors.

A level of specificity required for successful disease targeting will be achieved partly because the
20 local endothelial cells will be induced to express, or reveal, receptors that are not present, or are under-expressed or masked, on normal endothelial cells. With tumors, further specificity will result due to the fact that endothelial cells in the tumor will capture the
25 tumor-derived factors, and bind them to the cell surface, reducing the amount of ligand available for other tissues. When combined with the further dilution of the factor or ligand by distribution in the blood and tissue fluid pool, endothelial cells in normal tissues will be
30 expected to bind relatively little of such factors. Thus, operationally, cell-surface bound ligands or factors will be able to be used as a tumor endothelial cell marker.

35 In addition to manufacture by the tumor cells themselves, tumor endothelial cell binding factors may

- 92 -

also originate from other cell types, such as macrophages and mast cells, that have infiltrated tumors, or may be elaborated by platelets that become activated within the tumor.

5

Further growth factors or ligands contemplated to be useful as tumor vasculature-associated targets include EGF, FGF, VEGF, TGF β , HGF (NaKamura, 1991), angiotropin, TGF- α , TNF- α , PD-ECGF and TIE binding ligands (Bicknell and Harris, 1992). The currently preferred targets are VEGF/VPF, the FGF family of proteins, transforming growth factor- β (TGF- β); TGF- α ; tumor necrosis factor- α (TNF- α); angiotropin; platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF); TIE binding ligands; pleiotropin.

15

Another aspect of the present invention is the use of targeting antibodies, or binding regions therefrom, that are specific for epitopes present only on ligand-receptor complexes, which epitopes are absent from both the individual (free) ligand and the receptor in its unbound form. These antibodies recognize and bind to the unique conformation that results when a ligand, such as a growth factor, binds to its receptor, such as a growth factor receptor, to form a specifically bound complex. Such epitopes are not present on the uncomplexed forms of the ligands or receptors.

20

The inventors contemplate that the ligand-receptor complexes to which these antibodies bind are present in significantly higher number on tumor-associated endothelial cells than on non-tumor associated endothelial cells. Such antibodies will therefore be useful as targeting agents and will serve to further increase the specificity of the bispecific coagulants of the invention.

25

30

35

- 93 -

(i) Receptor Constructs

Soluble binding domains of endothelial cell surface receptors are also contemplated for use as targeting ligands in the present invention. This concept is generally based upon the well-known sandwich binding phenomena that has been exploited in a variety of *in vitro* and *in vivo* binding protocols. Basically, as the endothelial cells express specific receptors, the cells bind to and adsorb the corresponding ligands, the ligands are then available for binding to further receptor constructs should they be introduced into the system.

A range of useful endothelial cell receptors has been identified in the foregoing sections, with VEGF/VPF, FGF, TGF β , TIE-1 and TIE-2 being particularly preferred targets. Each of these receptors could be manipulated to form a soluble binding domain for use as a targeting ligand.

4. Disease-Associated Stromal Cell Targets**(a) Extracellular Matrix/Stromal Targets**

The usefulness of the basement membrane markers in tumoral pathology was described by Birembaut *et al.* (1985). These studies showed that the distribution of basement membrane (BM) markers, type IV collagen, laminin (LM), heparan sulphate proteoglycan (HSP) and fibronectin (FN) were disrupted in tumoral pathology. Burtin *et al.* (1983) also described alterations of the basement membrane and connective tissue antigens in human metastatic lymph nodes.

- 94 -

A preferred target for use with the invention is RIBS. Ugarova et al. (1993) reported that conformational changes occur in fibrinogen and are elicited by its interaction with the platelet membrane glycoprotein GPIIb-IIIa. The binding of fibrinogen to membrane glycoprotein GPIIb-IIIa on activated platelets leads to platelet aggregation. This interaction results in conformational changes in fibrinogen as evidenced by the expression of receptor-induced binding sites, RIBS, epitopes which are expressed by the bound but not the free ligand.

Two RIBS epitopes have been localized by Ugarova et al. (1993). One sequence resides at γ 112-119 and is recognized by MAb 9F9; the second is the RGDF sequence at A α 95-98 and is recognized by mAb 155B16. These epitopes are also exposed by adsorption of fibrinogen onto a plastic surface and digestion of the molecule by plasmin. Proteolytic exposure of the epitopes coincides with cleavage of the carboxyl-terminal aspects of the A α -chains to form fragment X₂. The inaccessibility of the RGDF sequence at A α 95-98 in fibrinogen suggests that this sequence does not participate in the initial binding of the molecule to GPIIb-IIIa.

Binding of fibrinogen to its receptor alters the conformation of the carboxyl-terminal aspects of the A α -chains, exposing the sequences which reside in the coiled-coil connector segments between the D and E domains of the molecule, generating the RIBS epitopes. In practical terms, the RIBS sequences are proposed as epitopes for use in targeting with a coaguligand. The MAbs 9F9 and 155B16 may thus be advantageously used, as may the antibodies described by Zamarron et al. (1991).

- 95 -

(b) Additional Cellular Targets

The present invention has the further advantage that it may be used to direct coagulants to disease-associated vasculature by targeting them to cell types found within the disease region.

Platelets participate in hemostasis and thrombosis by adhering to injured blood vessel walls and accumulating at the site of injury. Although platelet deposition at sites of blood vessel injury is responsible for the primary arrest of bleeding under physiologic conditions, it can lead to vascular occlusion with ensuing ischemic tissue damage and thrombus embolization under pathologic conditions.

Interactions of platelets with their environment and with each other represent complex processes that are initiated at the cell surface. The surface membrane, therefore, provides a reactive interface between the external medium, including components of the blood vessel wall and plasma, and the platelet interior.

p-155, a multimeric platelet protein that is expressed on activated platelets (Hayward et al., 1991), may be targeted using the invention. Platelets respond to a large number of stimuli by undergoing complex biochemical and morphological changes. These changes are involved in physiological processes including adhesion, aggregation, and coagulation. Platelet activation produces membrane alterations that can be recognized by monoclonal antibodies. The monoclonal antibody JS-1 (Hayward et al., 1991) is one such antibody contemplated for use as part of a coaguligand.

35

- 96 -

Ligand-induced binding sites (LIBS) are sites expressed on cell surface receptors only after ligand binding causes the receptor to change shape, mediate subsequent biological events. These may be seen as counterparts to RIBS and are also preferred targets for use with the present invention.

13 anti-LIBS antibodies have been developed by Frelinger et. al. (1990; 1991), any one of which may be used to deliver a coagulant to a disease or tumor site in accordance herewith. The murine monoclonal antiplatelet antibodies MA-TSPI-1 (directed against human thrombospondin) and MA-PMI-2, MA-PMI-1, and MA-LIBS-1 (directed against LIBS on human platelet glycoprotein IIb/IIIa) of Dewerchin et al. (1991) may also be used, as may RUU 2.41 and LIBS-1 of Heynen et al. (1994); OP-G2 of Tomiyama et al. (1992); and Ab-15.

Many other targets, such as antigens on smooth muscle cells, pericytes, fibroblasts, macrophages and infiltrating lymphocytes and leukocytes may also be used.

B. Coagulating Agents

The second arm or element of the bispecific agents of the invention will be a component that is capable of promoting coagulation. "Coagulation promoting agents" may be coagulation factors, factors that indirectly stimulate coagulation, or they may be in the form of a second binding region that is capable of binding and releasing a coagulation factor or factor that indirectly stimulates coagulation.

- 97 -

1. Coagulation Factors

A variety of coagulation factors may be used in connection with the present invention, as exemplified by the agents set forth below. Where a coagulation factor is covalently linked to a first binding agent, a site distinct from its functional coagulating site is used to join the molecules. Appropriate joining regions distinct from the active sites, or functional regions, of the coagulation factors are also described in each of the following sections.

(a) Tissue Factor

Tissue factor (TF) is one agent capable of initiating blood coagulation. TF is the activator of the extrinsic pathway of blood coagulation and is not in direct contact with the blood under physiologically normal conditions (Osterud et al., 1986; Nemerson, 1988; Broze, 1992; Ruf & Edington, 1994). In vascular damage or activation by certain cytokines or endotoxin, however, TF will be exposed to the blood, either by the (sub)endothelial cells (Weiss et al., 1989) or by certain blood cells (Warr et al., 1990). TF will then complex with factor VIIa, which under normal conditions circulates at low concentrations in the blood (Wildgoose et al., 1992), and the TF/factor VIIa complex will start the coagulation cascade through the activation of factor X into factor Xa. The cascade will ultimately result in the formation of fibrin.

For this sequence of events to occur, the TF:VIIa complex has to be associated with a phospholipid surface upon which the coagulation-initiation complexes with factors IX or X can assemble (Ruf et al., 1991; Paborsky et al., 1991; Bach et al., 1986). For this reason,

- 98 -

truncated TF (or tTF), from which the transmembrane and cytoplasmic regions have been removed by truncating the gene, is a soluble protein having one hundred-thousandth of the factor X-activating activity of native TF (Ruf
5 et al., 1991).

(b) Clotting Factors

Thrombin, Factor V/Va and derivatives, Factor
10 VIII/VIIIa and derivatives, Factor IX/IXa and derivatives, Factor X/Xa and derivatives, Factor XI/XIa and derivatives, Factor XII/XIIa and derivatives, Factor XIII/XIIIa and derivatives, Factor X activator and Factor V activator may also be used in the present invention.

15

(c) Venom Coagulants

Russell's viper venom was shown to contain a coagulant protein by Williams and Esnouf in 1962. Kisiel
20 (1979) isolated a venom glycoprotein that activates Factor V; and Di Scipio et al. (1977) showed that a protease from the venom activates human Factor X. The Factor X activator is the component contemplated for use in this invention.

25

Monoclonal antibodies specific for the Factor X activator present in Russell's viper venom have also been produced (e.g., MP1 of Pukrittayakamee et al., 1983), and could be used to deliver the agent to a specific target
30 site within the body.

(d) Prostaglandins and Synthetic Enzymes

Thromboxane A₂ is formed from endoperoxides by the
35 sequential actions of the enzymes cyclooxygenase and thromboxane synthetase in platelet microsomes.

- 99 -

Thromboxane A₂ is readily generated by platelets and is a potent vasoconstrictor, by virtue of its capacity to produce platelet aggregation (Whittle et al., 1981).

5 Both thromboxane A₂ and active analogues thereof are contemplated for use in the present invention. A synthetic protocol for generating thromboxane A₂ is described by Bhagwat et al. (1985). The thromboxane A₂ analogues described by Ohuchida et. al. (1981)
10 (especially compound 2) are particularly contemplated for use herewith.

It is possible that thromboxane synthase, and other enzymes that synthesize platelet-activating
15 prostaglandins, may also be used as "coagulants" in the present context. Shen and Tai (1986a;b) describe monoclonal antibodies to, and immunoaffinity purification of, thromboxane synthase; and Wang et. al. (1991) report the cDNA for human thromboxane synthase.

20

(e) Inhibitors of Fibrinolysis

α 2-antiplasmin, or α 2-plasmin inhibitor, is a proteinase inhibitor naturally present in human plasma
25 that functions to efficiently inhibit the lysis of fibrin clots induced by plasminogen activator (Moroi & Aoki, 1976). α 2-antiplasmin is a particularly potent inhibitor, and is contemplated for use in the present invention.

30

α 2-antiplasmin may be purified as first described by Moroi and Aoki (1976). Other purification schemes are also available, such as using affinity chromatography on plasminogen-Sepharose, ion-exchange chromatography on
35 DEAE-Sephadex and chromatography on Concanavalin-A-Sepharose; or using affinity chromatography on a

- 100 -

Sepharose column bearing an elastase-digested plasminogen formulation containing the three N-terminal triple-loop structures in the plasmin A-chain (LBSI), followed by gel filtration (Wiman & Collen, 1977; Wiman, 1980, respectively).

As the cDNA sequence for $\alpha 2$ -antiplasmin is available (Tone et al., 1977), a preferred method for $\alpha 2$ -antiplasmin production will be via recombinant expression.

Monoclonal antibodies against $\alpha 2$ -antiplasmin are also available that may be used in the bispecific binding ligand embodiments of the invention. For example, Hattey et al. (1987) described two MAbs against $\alpha 2$ -antiplasmin, MPW2AP and MPW3AP. As each of these MAbs were reported to react equally well with native $\alpha 2$ -antiplasmin, they could both be used to deliver exogenous $\alpha 2$ -antiplasmin to a target site or to garner endogenous $\alpha 2$ -antiplasmin and concentrate it within the targeted region. Other antibodies, such as JTPI-2, described by Mimuro and colleagues, could also be used.

2. Agents that Bind Coagulation Factors

Another group of bispecific coagulating ligands of this invention are those in which the targeting region is not directly linked to a coagulation factor, but is linked to a second binding region that binds to a coagulating factor.

Where a second binding region is used to bind and deliver a coagulation factor, the binding region is chosen so that it recognizes a site on the coagulation factor that does not significantly impair its ability to induce coagulation. The regions of the coagulation

- 101 -

factors suitable for binding in this manner will generally be the same as those regions that are suitable for covalent linking to the targeting region, as described in the previous sections.

5

However, in that bispecific ligands of this class may be expected to release the coagulation factor following delivery to the tumor site or region, there is more flexibility allowed in the regions of the coagulation factor suitable for binding to a second binding agent or antibody. Another advantage is that bispecific antibodies can be pre-localized before infusion of tTF which may reduce the amount of tTf required and hence toxicity.

15

Suitable second binding regions for use in this manner, will generally be antigen combining sites of antibodies that have binding specificity for the coagulation factor, including functional portions of antibodies, such as scFv, Fv, Fab', Fab and F(ab')₂ fragments.

20

Bispecific binding ligands that contain antibodies, or fragments thereof, directed against Tissue Factor, Thrombin, Prekallikrein, Factor V/Va, Factor VIII/VIIIa, Factor IX/IXa, Factor X/Xa, Factor XI/XIa, Factor XII/XIIa, Factor XIII/XIIIa, Russell's viper venom, thromboxane A₂ or α 2-antiplasmin are exemplary embodiments of this aspect of the invention.

30

C. Linkage Means

The first, targeting region and second, coagulating region will be operatively linked to allow each region to perform its intended function without significant impairment. Thus, the targeting region is capable of

35

- 102 -

binding to the intended target, as selected from the range of tumor environment targets, and the coagulating region is capable of directly or indirectly, e.g., through the release of a bound factor, promoting blood
5 coagulation or clotting.

To assess the targeting region binding function, all that is required is to conduct a binding assay to ensure that the bispecific ligand still binds to the targeted
10 component in substantially the same manner as the uncomplexed first binding region. The suitable binding assays are of the type usually seen in immunological binding assays, where the first targeting region is an antibody, and/or other biochemical binding assays, e.g.,
15 those using 125 Iodine labeled proteins or other radiolabeled components, as used to assess ligand-receptor binding, to generate Scatchard plots, and the like.

20 The target antigen or component in such assays may be provided in many forms, including proteins purified from natural or recombinant sources, membrane enriched preparations, intact cells and tissue sections. Generally, where protein compositions are used, they will
25 immobilized on a solid support, such as a microtitre plate, a membrane, or even on a column matrix. It is also generally preferred to use a target composition that reflects the physiological target, therefore as the target will usually be cell-associated, the use of
30 compositions that include intact cells, including tissues and the cells themselves, is also preferred.

The various immunological assays available to confirm the functional binding of a bispecific complex
35 include, e.g., Western blots, ELISAs, ELISAs using fixed cells, immunohistochemistry, and fluorescent activated

- 103 -

cell sorting (FACS). The execution of all such assays is generally known to those of skill in the art, and is further disclosed herein.

5 Assessing the targeting region binding function of a bispecific compound in any of the above or other binding assays is a straightforward matter, where the bispecific ligand and the uncomplexed first binding region will most usually be run in a parallel assay, under the same
10 conditions, to enable ready comparison. Effective bispecific ligands will bind to the target without significant impairment, i.e., in substantially the same manner as the uncomplexed first binding region. Taking the uncomplexed binding region assay result as the 100%
15 reference value, "substantial binding" of the bispecific ligand, as used herein, means that the bispecific ligand exhibits at least about 50% binding, and more preferably, between about 50% and about 80% binding, and most preferably, between about 80% and about 100% binding.

20 Where the bispecific ligand includes a second binding region that binds to a coagulant, e.g., it is a bispecific antibody, further useful assays are those of the type that allow the binding functions of both arms of
25 the bispecific ligand to be assessed at the same time. For example, this may be achieved by assessing the binding of a radiolabeled coagulant to a target cell via bridging with the bispecific ligand or antibody. Such an assay is exemplified by the binding of tTF to target
30 cells using the B21-2/10H10 bispecific antibody, as described in Example II.

 Determining the coagulating agent function of the bispecific ligand is also a straightforward matter. All
35 that is required here is to conduct a coagulation assay using the bispecific ligand and ensure that it functions

- 104 -

to promote coagulation in substantially the same manner as the uncomplexed coagulating agent. This is true for "coagulating agents" that are both coagulation factors themselves and those that are second binding regions that bind to a coagulation factor. Naturally, in the latter case, in an *in vitro* or *ex vivo* assay, the bispecific ligand will be precomplexed with the coagulation factor to allow binding to the second binding region.

One suitable coagulation assay is that in which the bispecific ligands, pre-complexed with coagulant if necessary, are admixed with a plasma sample. The appearance of fibrin strands is indicative of coagulation in this assay. Effective bispecific ligands would thus be expected to reduce the time taken for fibrin strands to appear, and particularly, to significantly reduce the elapsed time in comparison to control levels.

A variation of the above assay involves first exposing appropriate target cells to the bispecific ligand under conditions effective, and for a time sufficient, to allow binding, washing the cells to remove non-specifically bound components and then resuspending the washed cells in plasma. Only cells effectively coated with the bispecific ligand would be expected to reduce the time taken for fibrin strands to appear in the assay. This type of assay is preferred in that it is, in itself, an assay that assesses both of the functions of the bispecific construct, i.e., initial targeting to the cell and subsequent localized coagulation.

To compare the coagulating function of a bispecific compound to that of an uncomplexed coagulating agent, parallel assays may again be conducted. Effective bispecific ligands will function to promote coagulation without significant impairment, i.e., will function in

- 105 -

substantially the same manner as the uncomplexed coagulating agent. Taking the uncomplexed coagulant assay result as the 100% reference value, "substantial function", as used herein, means that the bispecific
5 ligand exhibits at least about 50% coagulation, and more preferably, between about 50% and about 80% coagulation, and most preferably, between about 80% and about 100% coagulation.

10 The two functional regions of the bispecific ligands may be joined using synthetic chemistry techniques or recombinant DNA techniques. Each of these techniques are routinely employed and well known to those of skill in the art, and are further exemplified in Example I and by
15 the details set forth below.

1. Biochemical Cross-linkers

The joining of an antibody, or other targeting
20 component, to a coagulating agent will generally employ the same technology as developed for the preparation of immunotoxins. However, considerable advantages are apparent in the present technology, as the consequences of a certain amount of uncomplexed coagulating agent
25 becoming available physiologically are not contemplated to be particularly severe. Thus, the stability requirements for any cross-linkers are not so stringent as for linkers employed in other constructs, such as immunotoxins. Therefore, it can be considered as a
30 general guideline that any biochemical crosslinker that is appropriate for use in an immunotoxin will also be of use in the present context, and additional linkers may also be considered.

35 In addition to toxins, a variety of other chemotherapeutic and pharmacological agents have been

- 106 -

linked to antibodies to form conjugates that have been shown to function pharmacologically (see, e.g., Vaickus *et al.*, 1991). Exemplary antineoplastic agents that have been investigated include doxorubicin, daunomycin, methotrexate and vinblastine, amongst others (Dillman *et al.*, 1988; Pietersz *et al.*, 1988). Moreover, the attachment of other agents such as neocarzinostatin (Kimura *et al.*, 1983), macromycin (Manabe *et al.*, 1984), trenimon (Ghose, 1982) and α -amanitin (Davis & Preston, 1981) has been described. The linking technology described in each of the foregoing scientific papers is also contemplated for use in connection with the present invention.

Cross-linking reagents are used to form molecular bridges that tie together functional groups of two different molecules, e.g., a binding and coagulating agent. To link two different proteins in a step-wise manner, heterobifunctional cross-linkers can be used that eliminate unwanted homopolymer formation (Table VI).

-107-

TABLE VI
HETEROBIFUNCTIONAL CROSS-LINKERS

linker	Reactive Toward	Advantages and Applications	Spacer Arm Length\after cross-linking
SMPT	Primary amines Sulfhdryls	<ul style="list-style-type: none"> Greater stability 	11.2 Å
SPDP	Primary amines Sulfhdryls	<ul style="list-style-type: none"> Thiolation Cleavable cross-linking 	6.8 Å
LC-SPDP	Primary amines Sulfhdryls	<ul style="list-style-type: none"> Extended spacer arm 	15.6 Å
Sulfo-LC-SPDP	Primary amines Sulfhdryls	<ul style="list-style-type: none"> Extended spacer arm Water-soluble 	15.6 Å
SMCC	Primary amines Sulfhdryls	<ul style="list-style-type: none"> Stable maleimide reactive group Enzyme-antibody conjugation Hapten-carrier protein conjugation 	11.6 Å
Sulfo-SMCC	Primary amines Sulfhdryls	<ul style="list-style-type: none"> Stable maleimide reactive group Water-soluble Enzyme-antibody conjugation 	11.6 Å
MBS	Primary amines Sulfhdryls	<ul style="list-style-type: none"> Enzyme-antibody conjugation Hapten-carrier protein conjugation 	9.9 Å
Sulfo-MBS	Primary amines Sulfhdryls	<ul style="list-style-type: none"> Water-soluble 	9.9 Å

5

10

-108-

TABLE VI continued...

linker	Reactive Toward	Advantages and Applications	Spacer Arm Length\after cross-linking
SIAB	Primary amines Sulphydryls	• Enzyme-antibody conjugation	10.6 Å
Sulfo-SIAB	Primary amines Sulphydryls	• Water-soluble	10.6 Å
SMPB	Primary amines Sulphydryls	• Extended spacer arm • Enzyme-antibody conjugation	14.5 Å
Sulfo-SMPB	Primary amines Sulphydryls	• Extended spacer arm • Water-soluble	14.5 Å
EDC/Sulfo-NHS	Primary amines Carboxyl groups	• Hapten-Carrier conjugation	0
ABH	Carbohydrates Nonselective	• Reacts with sugar groups	11.9 Å

- 109 -

An exemplary heterobifunctional cross-linker contains two reactive groups: one reacting with primary amine group (e.g., N-hydroxy succinimide) and the other reacting with a thiol group (e.g., pyridyl disulfide, maleimides, halogens, etc.). Through the primary amine reactive group, the cross-linker may react with the lysine residue(s) of one protein (e.g., the selected antibody or fragment) and through the thiol reactive group, the cross-linker, already tied up to the first protein, reacts with the cysteine residue (free sulfhydryl group) of the other protein (e.g., the coagulant).

It can therefore be seen that the preferred coagulants or coagulant binding regions will generally have, or be derivatized to have, a functional group available for cross-linking purposes. This requirement is not considered to be limiting in that a wide variety of groups can be used in this manner. For example, primary or secondary amine groups, hydrazide or hydrazine groups, carboxyl alcohol, phosphate, or alkylating groups may be used for binding or cross-linking. For a general overview of linking technology, one may wish to refer to Ghose & Blair (1987).

The spacer arm between the two reactive groups of a cross-linkers may have various length and chemical compositions. A longer spacer arm allows a better flexibility of the conjugate components while some particular components in the bridge (e.g., benzene group) may lend extra stability to the reactive group or an increased resistance of the chemical link to the action of various aspects (e.g., disulfide bond resistant to reducing agents). The use of peptide spacers, such as L-Leu-L-Ala-L-Leu-L-Ala, is also contemplated.

- 110 -

It is preferred that a cross-linker having reasonable stability in blood will be employed. Numerous types of disulfide-bond containing linkers are known that can be successfully employed to conjugate targeting and coagulating agents. Linkers that contain a disulfide bond that is sterically hindered may prove to give greater stability *in vivo*, preventing release of the coagulant prior to binding at the site of action. These linkers are thus one preferred group of linking agents.

10

One of the most preferred cross-linking reagents for use in immunotoxins is SMPT, which is a bifunctional cross-linker containing a disulfide bond that is "sterically hindered" by an adjacent benzene ring and methyl groups. It is believed that steric hindrance of the disulfide bond serves a function of protecting the bond from attack by thiolate anions such as glutathione which can be present in tissues and blood, and thereby help in preventing decoupling of the conjugate prior to the delivery of the attached agent to the tumor site. It is contemplated that the SMPT agent may also be used in connection with the bispecific coagulating ligands of this invention.

25

The SMPT cross-linking reagent, as with many other known cross-linking reagents, lends the ability to cross-link functional groups such as the SH of cysteine or primary amines (e.g., the epsilon amino group of lysine). Another possible type of cross-linker includes the heterobifunctional photoreactive phenylazides containing a cleavable disulfide bond such as sulfosuccinimidyl-2-(p-azido salicylamido) ethyl-1,3'-dithiopropionate. The N-hydroxy-succinimidyl group reacts with primary amino groups and the phenylazide (upon photolysis) reacts non-selectively with any amino acid residue.

30

35

- 111 -

In addition to hindered cross-linkers, non-hindered linkers can also be employed in accordance herewith. Other useful cross-linkers, not considered to contain or generate a protected disulfide, include SATA, SPDP and 2-iminothiolane (Wawrzynczak & Thorpe, 1987). The use of such cross-linkers is well understood in the art.

Once conjugated, the bispecific agent will generally be purified to separate the conjugate from unconjugated targeting agents or coagulants and from other contaminants. It is important to remove unconjugated targeting agent to avoid the possibility of competition for the antigen between conjugated and unconjugated species. A large a number of purification techniques are available for use in providing conjugates of a sufficient degree of purity to render them clinically useful. Purification methods based upon size separation, such as gel filtration, gel permeation or high performance liquid chromatography, will generally be of most use. Other chromatographic techniques, such as Blue-Sepharose separation, may also be used.

2. Recombinant Fusion Proteins

The bispecific targeted coagulants of the invention may also be fusion proteins prepared by molecular biological techniques. The use of recombinant DNA techniques to achieve such ends is now standard practice to those of skill in the art. These methods include, for example, *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques and *in vivo* recombination/genetic recombination. DNA and RNA synthesis may, additionally, be performed using an automated synthesizers (see, for example, the techniques described in Sambrook et al., 1989; and Ausubel et al., 1989).

- 112 -

In general, to prepare a fusion a protein one would join a DNA coding region, such as a gene or cDNA, encoding a binding ligand or other targeting region to a DNA coding region (i.e., gene or cDNA) encoding a coagulation factor or coagulant binding region. This typically involves preparing an expression vector that comprises, in the same reading frame, a first DNA segment encoding the first binding region operatively linked to a second DNA segment encoding the coagulation factor. The sequences are attached in a manner such that translation of the total nucleic acid yields the desired bispecific compounds of the invention. Expression vectors contain one or more promoters upstream of the inserted DNA regions that act to promote transcription of the DNA and to thus promote expression of the encoded recombinant protein. This is the meaning of "recombinant expression".

Should a particular binding region or coagulant be preferred, and the encoding DNA not instantly available, it may be obtained using the techniques of "molecular cloning" in which a DNA molecule encoding the desired protein is obtained from a DNA library (e.g., a cDNA or genomic library). In such procedures, an appropriate DNA library is screened, e.g., using an expression screening protocol employing antibodies directed against the protein, or activity assays. Alternatively, screening may be based on the hybridization of oligonucleotide probes, designed from a consideration of portions of the amino acid sequence of the protein, or from the DNA sequences of genes encoding related proteins. The operation of such screening protocols are well known to those of skill in the art and are described in detail in the scientific literature, for example, in Sambrook et al. (1989).

- 113 -

When produced via recombinant DNA techniques, the targeting agent/coagulating agent compounds of the invention are referred to as "fusion proteins". It is to be understood that such fusion proteins contain, at least, a targeting agent and a coagulating agent as defined in this invention, and that the agents are operatively attached. The fusion proteins may also include additional peptide sequences, such as peptide spacers which operatively attach the targeting agent and coagulating agent compounds, as long as such additional sequences do not appreciably affect the targeting or coagulating activities of the resultant fusion protein.

It will be understood that the recombinant bispecific protein ligands may differ from those bispecific constructs generated by chemically cross-linking the so-called naturally-produced proteins. In particular, the degree of post-translational modifications, such as, for example, glycosylation and phosphorylation may be different between recombinant fusions and chemical fusions of the same two proteins. This is not contemplated to be a significant problem, however, those of skill in the art will know to confirm that a recombinant fusion protein functions as intended, and expected from other data, before use in a clinical setting.

One advantage of recombinant expression is that the linking regions can be readily manipulated so that, e.g., their length and/or amino acid composition is readily variable. Non-cleavable peptide spacers may be provided to operatively attach the two agents of the invention, if desired. Equally, peptides with unique cleavage sites could be inserted between the two components.

35

- 114 -

If desired in a specific instance, it is possible to provide a peptide spacer operatively attaching the targeting agent and coagulating agent which is capable of folding into a disulfide-bonded loop structure.

5 Proteolytic cleavage within the loop would then yield a heterodimeric polypeptide wherein the targeting agent and the coagulating agent are linked by only a single disulfide bond (see, for example, Lord et al., 1992).

10 Many standard techniques are available to construct expression vectors containing the appropriate nucleic acids and transcriptional/ translational control sequences in order to achieve protein expression in a variety of host-expression systems. The cell types
15 available for expression include, but are not limited to, microorganisms such as bacteria (e.g., *E. coli*, *B. subtilis*) transformed with recombinant bacteriophage DNA, plasmid DNA or cosmid DNA expression vectors containing targeting agent/coagulant coding sequences;
20 yeast (e.g., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformed with recombinant yeast expression vectors containing targeting agent/coagulating agent coding sequences; insect cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., baculovirus) containing the targeting
25 agent/coagulating agent coding sequences; plant cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or transformed with recombinant plasmid expression vectors (e.g., Ti plasmid) containing
30 the targeting agent/coagulant coding sequence; and mammalian cell systems (e.g., COS, CHO, BHK, 293, 3T3) harboring recombinant expression constructs containing promoters derived from the genome of mammalian cells (e.g., metallothionein promoter) or from mammalian
35 viruses (e.g., the adenovirus late promoter; the vaccinia virus 7.5K promoter).

- 115 -

In bacterial systems a number of expression vectors may be advantageously selected depending upon the use intended for the targeting agent/coagulating agent construct being expressed. For example, when large quantities of bispecific agent are to be produced, vectors that direct the expression of high levels of fusion protein products that are readily purified may be desirable. Such vectors include, but are not limited to, the *E. coli* expression vector pUR278 (Ruther et al., 1983), in which the targeting agent/coagulating agent coding sequence may be ligated individually into the vector in frame with the lac Z coding region so that a fusion protein additionally containing a portion of the lac Z product is provided; pIN vectors (Inouye et al., 1985; Van Heeke et al., 1989); and the like. pGEX vectors may also be used to express foreign polypeptides, such as the targeting agent/coagulating agent combinations as fusion proteins additionally containing glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption to glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. The pGEX vectors are designed to include thrombin or factor Xa protease cleavage sites so that the binding agent/coagulant protein of the overall fusion protein can be released from the GST moiety.

In a useful insect system, *Autographa californica* nuclear polyhidrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes. The virus grows in *Spodoptera frugiperda* cells. The targeting agent/coagulating agent coding sequences may be cloned into non-essential regions (for example the polyhedrin gene) of the virus and placed under control of an AcNPV promoter (for example the polyhedrin promoter). Successful insertion of the bispecific ligand coding sequences will result in

- 116 -

inactivation of the polyhedrin gene and production of non-occluded recombinant virus (*i.e.*, virus lacking the proteinaceous coat coded for by the polyhedrin gene). These recombinant viruses are then used to infect

5 *Spodoptera frugiperda* cells in which the inserted gene is expressed (*e.g.*, see Smith *et al.*, 1983; *U.S. Patent No. 4,215,051, Smith).

In mammalian host cells, a number of viral based expression systems may be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, the targeting agent/coagulating agent coding sequences may be ligated to an adenovirus transcription/ translation control complex, *e.g.*, the late promoter and tripartite leader

10 sequence. This chimeric gene may then be inserted in the adenovirus genome by *in vitro* or *in vivo* recombination. Insertion in a non-essential region of the viral genome (*e.g.*, region E1 or E3) will result in a recombinant virus that is viable and capable of expressing bispecific

15 proteins in infected hosts (*e.g.*, see Logan *et al.*, 1984).

Specific initiation signals may also be required for efficient translation of inserted targeting

25 agent/coagulating agent coding sequences. These signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. Exogenous translational control signals, including the ATG initiation codon, may additionally need to be provided. One of ordinary skill in the art would readily

30 be capable of determining this and providing the necessary signals. It is well known that the initiation codon must be in phase (or in-frame) with the reading frame of the desired coding sequence to ensure translation of the entire insert. These exogenous

35 translational control signals and initiation codons can be of a variety of origins, both natural and synthetic.

- 117 -

The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of appropriate transcription enhancer elements, transcription terminators, etc. (see Bittner et al., 1987).

5

In addition, a host cell strain may be chosen which modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific fashion desired. Such modifications (e.g., glycosylation) and processing (e.g., cleavage) of protein products may be important for the function of the protein. Different host cells have characteristic and specific mechanisms for the post-translational processing and modification of proteins. Appropriate cells lines or host systems can be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein expressed. To this end, eukaryotic host cells which possess the cellular machinery for proper processing of the primary transcript, glycosylation, and phosphorylation of the gene product may be used. Such mammalian host cells include, but are not limited to, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, etc.

For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is preferred. For example, cell lines that stably express constructs encoding the targeting agent/coagulant ligands may be engineered. Rather than using expression vectors that contain viral origins of replication, host cells can be transformed with targeting agent/coagulant DNA controlled by appropriate expression control elements (e.g., promoter, enhancer, sequences, transcription terminators, polyadenylation sites, etc.), and a selectable marker. Following the introduction of foreign DNA, engineered cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media, and then are switched to a selective media. The

- 118 -

selectable marker in the recombinant plasmid confers resistance to the selection and allows cells to stably integrate the plasmid into their chromosomes and grow to form foci which in turn can be cloned and expanded into cell lines.

A number of selection systems may be used, including, but not limited, to the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler et al., 1977), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Szybalska et al., 1962), and adenine phosphoribosyltransferase genes (Lowy et al., 1980) can be employed in tk-, hgprt- or aprt-cells, respectively. Also, antimetabolite resistance can be used as the basis of selection for dhfr, which confers resistance to methotrexate (Wigler et al., 1980; O'Hare et al., 1981); gpt, which confers resistance to mycophenolic acid (Mulligan et al., 1981); neo, which confers resistance to the aminoglycoside G-418 (Colberre-Garapin et al., 1981); and hygromycin (Santerre et al., 1984).

D. Antibodies

Where antibodies are used as one or both portions of the bispecific ligand, the choice of antibody will generally be dependent on the type tumor and coagulating ligand chosen. However, certain advantages may be achieved through the application of particular types of antibodies. For example, while IgG based antibodies may be expected to exhibit better binding capability and slower blood clearance than their Fab' counterparts, Fab' fragment-based compositions will generally exhibit better tissue penetrating capability.

- 119 -

1. Monoclonal Antibodies

Means for preparing and characterizing antibodies are well known in the art (See, e.g., *Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

The methods for generating monoclonal antibodies (MAbs) generally begin along the same lines as those for preparing polyclonal antibodies. Briefly, a polyclonal antibody is prepared by immunizing an animal with an immunogenic composition in accordance with the present invention, either with or without prior immunotolerizing, depending on the antigen composition and protocol being employed (e.g., tolerizing to a normal cell population and then immunizing with a tumor cell population), and collecting antisera from that immunized animal. A wide range of animal species can be used for the production of antisera. Typically the animal used for production of anti-antisera is a rabbit, a mouse, a rat, a hamster, a guinea pig or a goat. Because of the relatively large blood volume of rabbits, a rabbit is a preferred choice for production of polyclonal antibodies.

As is well known in the art, a given composition may vary in its immunogenicity. It is often necessary therefore to boost the host immune system, as may be achieved by coupling a peptide or polypeptide immunogen to a carrier. Exemplary and preferred carriers are keyhole limpet hemocyanin (KLH) and bovine serum albumin (BSA). Other albumins such as ovalbumin, mouse serum albumin or rabbit serum albumin can also be used as carriers. Means for conjugating a polypeptide to a carrier protein are well known in the art and include glutaraldehyde, m-maleimidobencoyl-N-hydroxysuccinimide ester, carbodiimide and bis-biazotized benzidine.

- 120 -

As is also well known in the art, the immunogenicity of a particular immunogen composition can be enhanced by the use of non-specific stimulators of the immune response, known as adjuvants. Exemplary and preferred adjuvants include complete Freund's adjuvant (a non-specific stimulator of the immune response containing killed *Mycobacterium tuberculosis*), incomplete Freund's adjuvants and aluminum hydroxide adjuvant.

The amount of immunogen composition used in the production of polyclonal antibodies varies upon the nature of the immunogen as well as the animal used for immunization. A variety of routes can be used to administer the immunogen (subcutaneous, intramuscular, intradermal, intravenous and intraperitoneal). The production of polyclonal antibodies may be monitored by sampling blood of the immunized animal at various points following immunization. A second, booster injection, may also be given. The process of boosting and titering is repeated until a suitable titer is achieved. When a desired titer level is obtained, the immunized animal can be bled and the serum isolated and stored, and/or the animal can be used to generate MAbs.

MAbs may be readily prepared through use of well-known techniques, such as those exemplified in *U.S. Patent 4,196,265, incorporated herein by reference. Typically, this technique involves immunizing a suitable animal with a selected immunogen composition, e.g., a purified or partially purified tumor cell or vascular endothelial cell protein, polypeptide, peptide, or intact cell composition. The immunizing composition is administered in a manner effective to stimulate antibody producing cells. Rodents such as mice and rats are preferred animals, however, the use of rabbit, sheep frog cells is also possible. The use of rats may provide

- 121 -

certain advantages (*Goding, 1986, pp. 60-61), but mice are preferred, with the BALB/c mouse being most preferred as this is most routinely used and generally gives a higher percentage of stable fusions.

5

Following immunization, somatic cells with the potential for producing antibodies, specifically B lymphocytes (B cells), are selected for use in the MAb generating protocol. These cells may be obtained from biopsied spleens, tonsils or lymph nodes, or from a peripheral blood sample. Spleen cells and peripheral blood cells are preferred, the former because they are a rich source of antibody-producing cells that are in the dividing plasmablast stage, and the latter because peripheral blood is easily accessible. Often, a panel of animals will have been immunized and the spleen of animal with the highest antibody titer will be removed and the spleen lymphocytes obtained by homogenizing the spleen with a syringe. Typically, a spleen from an immunized mouse contains approximately 5×10^7 to 2×10^8 lymphocytes.

The antibody-producing B lymphocytes from the immunized animal are then fused with cells of an immortal myeloma cell, generally one of the same species as the animal that was immunized. Myeloma cell lines suited for use in hybridoma-producing fusion procedures preferably are non-antibody-producing, have high fusion efficiency, and enzyme deficiencies that render them incapable of growing in certain selective media which support the growth of only the desired fused cells (hybridomas).

Any one of a number of myeloma cells may be used, as are known to those of skill in the art (*Goding, pp. 65-66, 1986; *Campbell, pp. 75-83, 1984). For example, where the immunized animal is a mouse, one may use

- 122 -

P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 and S194/5XX0 Bul; for rats, one may use R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F, 4B210 or one of the above listed mouse cell lines; and U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 and UC729-6, are all useful in connection with human cell fusions.

One preferred murine myeloma cell is the A63-A68, 653 myeloma cell line, which is readily available from the ATCC. Another mouse myeloma cell line that may be used is the 8-azaguanine-resistant mouse murine myeloma SP2/0 non-producer cell line.

Methods for generating hybrids of antibody-producing spleen or lymph node cells and myeloma cells usually comprise mixing somatic cells with myeloma cells in a 4:1 proportion, though the proportion may vary from about 20:1 to about 1:1, respectively, in the presence of an agent or agents (chemical or electrical) that promote the fusion of cell membranes. Fusion methods using Sendai virus have been described by Kohler & Milstein (1975; 1976), and those using polyethylene glycol (PEG), such as 37% (v/v) PEG, by Gefter et al. (1977). The use of electrically induced fusion methods is also appropriate (*Goding pp. 71-74, 1986).

Fusion procedures usually produce viable hybrids at low frequencies, about 1×10^{-6} to 1×10^{-8} . However, this does not pose a problem, as the viable, fused hybrids are differentiated from the parental, unfused cells (particularly the unfused myeloma cells that would normally continue to divide indefinitely) by culturing in a selective medium. The selective medium is generally one that contains an agent that blocks the *de novo* synthesis of nucleotides in the tissue culture media. Exemplary and preferred agents are aminopterin,

- 123 -

methotrexate, and azaserine. Aminopterin and methotrexate block *de novo* synthesis of both purines and pyrimidines, whereas azaserine blocks only purine synthesis. Where aminopterin or methotrexate is used, the media is supplemented with hypoxanthine and thymidine as a source of nucleotides (HAT medium). Where azaserine is used, the media is supplemented with hypoxanthine.

The preferred selection medium is HAT. Only cells capable of operating nucleotide salvage pathways are able to survive in HAT medium. The myeloma cells are defective in key enzymes of the salvage pathway, e.g., hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT), and they cannot survive. The B cells can operate this pathway, but they have a limited life span in culture and generally die within about two weeks. Therefore, the only cells that can survive in the selective media are those hybrids formed from myeloma and B cells.

This culturing provides a population of hybridomas from which specific hybridomas are selected. Typically, selection of hybridomas is performed by culturing the cells by single-clone dilution in microtiter plates, followed by testing the individual clonal supernatants (after about two to three weeks) for the desired reactivity. The assay should be sensitive, simple and rapid, such as radioimmunoassays, enzyme immunoassays, cytotoxicity assays, plaque assays, dot immunobinding assays, and the like.

The selected hybridomas would then be serially diluted and cloned into individual antibody-producing cell lines, which clones can then be propagated indefinitely to provide MAbs. The cell lines may be exploited for MAb production in two basic ways. A sample of the hybridoma can be injected (often into the

- 124 -

peritoneal cavity) into a histocompatible animal of the type that was used to provide the somatic and myeloma cells for the original fusion. The injected animal develops tumors secreting the specific monoclonal antibody produced by the fused cell hybrid. The body fluids of the animal, such as serum or ascites fluid, can then be tapped to provide MAbs in high concentration. The individual cell lines could also be cultured *in vitro*, where the MAbs are naturally secreted into the culture medium from which they can be readily obtained in high concentrations. MAbs produced by either means may be further purified, if desired, using filtration, centrifugation and various chromatographic methods such as HPLC or affinity chromatography.

15

The inventors also contemplate the use of a molecular cloning approach to generate monoclonals. For this, combinatorial immunoglobulin phagemid libraries are prepared from RNA isolated from the spleen of the immunized animal, and phagemids expressing appropriate antibodies are selected by panning using cells expressing the antigen and control cells e.g., normal-versus-tumor cells. The advantages of this approach over conventional hybridoma techniques are that approximately 10^4 times as many antibodies can be produced and screened in a single round, and that new specificities are generated by H and L chain combination which further increases the chance of finding appropriate antibodies.

30

Where MAbs are employed in the present invention, they may be of human, murine, monkey, rat, hamster, chicken or even rabbit origin. The invention contemplates the use of human antibodies, "humanized" or chimeric antibodies from mouse, rat, or other species, bearing human constant and/or variable region domains, and other recombinant antibodies and fragments thereof.

35

- 125 -

Of course, due to the ease of preparation and ready availability of reagents, murine monoclonal antibodies will typically be preferred.

5 **2. Functional Antibody Binding Regions**

 The origin or derivation of the targeting agent antibody or antibody fragment (e.g., Fab', Fab, F(ab')₂, Fv or scFv) is not believed to be particularly crucial to the practice of the invention, so long as the antibody or fragment that is actually employed for the preparation of the bispecific ligand exhibits the desired binding properties.

15 It may be necessary to use antibody preparations in which the Fc portion has been removed. Fragmentation of immunoglobulin molecules can be achieved by controlled proteolysis, although the conditions will vary considerably with species and immunoglobulin class or subclass. Bivalent F(ab')₂ fragments are usually preferable over the univalent Fab or Fab' fragments.

Fab

25 Fab fragments can be obtained by proteolysis of the whole immunoglobulin by the non-specific thiol protease, papain. Papain must first be activated by reducing the sulphydryl group in the active site with cysteine, 2-mercaptoethanol or dithiothreitol. Heavy metals in the stock enzyme should be removed by chelation with EDTA (2 mM) to ensure maximum enzyme activity. Enzyme and substrate are normally mixed together in the ratio of 1:100 by weight. After incubation, the reaction can be stopped by irreversible alkylation of the thiol group with iodoacetamide or simply by dialysis. The completeness of the digestion should be monitored by SDS-

- 126 -

PAGE and the various fractions separated by protein A-Sepharose or ion exchange chromatography.

$F(ab')_2$

5

The usual procedure for preparation of $F(ab')_2$ fragments from IgG of rabbit and human origin is limited proteolysis by the enzyme pepsin (Protocol 7.3.2). The conditions, 100x antibody excess w/w in acetate buffer at pH 4.5, 37°C, suggest that antibody is cleaved at the C-terminal side of the inter-heavy-chain disulfide bond. Rates of digestion of mouse IgG may vary with subclass and it may be difficult to obtain high yields of active $F(ab')_2$ fragments without some undigested or completely degraded IgG. In particular, IgG_{2b} is highly susceptible to complete degradation. The other subclasses require different incubation conditions to produce optimal results.

20 Digestion of rat IgG by pepsin requires conditions including dialysis in 0.1 M acetate buffer, pH 4.5, and then incubation for four hours with 1% w/w pepsin; IgG₁ and IgG_{2a} digestion is improved if first dialysed against 0.1 M formate buffer, pH 2.8, at 4°C, for 16 hours followed by acetate buffer. IgG_{2b} gives more consistent results with incubation in staphylococcal V8 protease (3% w/w) in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.8, for four hours at 37°C.

30 3. Bispecific Antibodies

In general, the preparation of bispecific antibodies is also well known in the art, as exemplified by Glennie et al. (1987). Bispecific antibodies have been employed clinically, for example, to treat cancer patients (Bauer et al., 1991). One method for the preparation of

- 127 -

bispecific antibodies involves the separate preparation of antibodies having specificity for the targeted tumor cell antigen, on the one hand, and the coagulating agent (or other desired target, such as an activating antigen) on the other.

Bispecific antibodies have also been developed particularly for use as immunotherapeutic agents. As mentioned earlier in conjunction with antigen-induction, certain of these antibodies were developed to cross-link lymphocytes and tumor antigens (Nelson, 1991; Segal et al., 1992). Examples include chimeric molecules that bind T cells, e.g., at CD3, and tumor antigens, and trigger lymphocyte-activation by physically cross-linking the TCR/CD3 complex in close proximity to the target cell (Staerz et al., 1985; Perez et al., 1985; 1986a; 1986b; Ting et al., 1988).

Indeed, tumor cells of carcinomas, lymphomas, leukemias and melanomas have been reported to be susceptible to bispecific antibody-mediated killing by T cells (Nelson, 1991; Segal et al., 1992; deLeij et al., 1991). These type of bispecific antibodies have also been used in several Phase I clinical trials against diverse tumor targets. Although they are not novel compositions in accordance with this invention, the combined use of bispecific cross-linking antibodies along with the bispecific coagulating ligands described herein is also contemplated. The bispecific cross-linking antibodies may be administered as described in references such as deLeij et al. (1991); Clark et al. (1991); Rivoltini et al. (1992); Bolhuis et al. (1992); and Nitta et al. (1990).

While numerous methods are known in the art for the preparation of bispecific antibodies, the Glennie et al.

- 128 -

(1987) method involves the preparation of peptic $F(ab'\gamma)_2$ fragments from the two chosen antibodies, followed by reduction of each to provide separate $Fab'\gamma_{SH}$ fragments. The SH groups on one of the two partners to be coupled are then alkylated with a cross-linking reagent such as o-phenylenedimaleimide to provide free maleimide groups on one partner. This partner may then be conjugated to the other by means of a thioether linkage, to give the desired $F(ab'\gamma)_2$ heteroconjugate.

10

Due to ease of preparation, high yield and reproducibility, the Glennie et al. (1987) method is often preferred for the preparation of bispecific antibodies, however, there are numerous other approaches that can be employed and that are envisioned by the inventors. For example, other techniques are known wherein crosslinking with SPDP or protein A is carried out, or a trispecific construct is prepared (Titus et al., 1987; Tutt et al., 1991).

20

Another method for producing bispecific antibodies is by the fusion of two hybridomas to form a quadroma (Flavell et al., 1991, 1992; Pimm et al., 1992; French et al., 1991; Embleton et al., 1991). As used herein, the term "quadroma" is used to describe the productive fusion of two B cell hybridomas. Using now standard techniques, two antibody producing hybridomas are fused to give daughter cells, and those cells that have maintained the expression of both sets of clonotype immunoglobulin genes are then selected.

30

A preferred method of generating a quadroma involves the selection of an enzyme deficient mutant of at least one of the parental hybridomas. This first mutant hybridoma cell line is then fused to cells of a second hybridoma that had been lethally exposed, e.g., to

35

- 129 -

iodoacetamide, precluding its continued survival. Cell fusion allows for the rescue of the first hybridoma by acquiring the gene for its enzyme deficiency from the lethally treated hybridoma, and the rescue of the second hybridoma through fusion to the first hybridoma. Preferred, but not required, is the fusion of immunoglobulins of the same isotype, but of a different subclass. A mixed subclass antibody permits the use if an alternative assay for the isolation of a preferred quadroma.

In more detail, one method of quadroma development and screening involves obtaining a hybridoma line that secretes the first chosen MAb and making this deficient for the essential metabolic enzyme, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT). To obtain deficient mutants of the hybridoma, cells are grown in the presence of increasing concentrations of 8-azaguanine ($1 \times 10^{-7}M$ to $1 \times 10^{-5}M$). The mutants are subcloned by limiting dilution and tested for their hypoxanthine/ aminopterin/ thymidine (HAT) sensitivity. The culture medium may consist of, for example, DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM L-Glutamine and 1 mM penicillin-streptomycin.

A complementary hybridoma cell line that produces the second desired MAb is used to generate the quadromas by standard cell fusion techniques (Galfre et al., 1981), or by using the protocol described by Clark et al. (1988). Briefly, 4.5×10^7 HAT-sensitive first cells are mixed with 2.8×10^7 HAT-resistant second cells that have been pre-treated with a lethal dose of the irreversible biochemical inhibitor iodoacetamide (5 mM in phosphate buffered saline) for 30 minutes on ice before fusion. Cell fusion is induced using polyethylene glycol (PEG) and the cells are plated out in 96 well microculture plates. Quadromas are selected using HAT-containing

- 130 -

medium. Bispecific antibody-containing cultures are identified using, for example, a solid phase isotype-specific ELISA and isotype-specific immunofluorescence staining.

5

In one identification embodiment to identify the bispecific antibody, the wells of microtiter plates (Falcon, Becton Dickinson Labware) are coated with a reagent that specifically interacts with one of the parent hybridoma antibodies and that lacks cross-reactivity with both antibodies. The plates are washed, blocked, and the supernatants (SNs) to be tested are added to each well. Plates are incubated at room temperature for 2 hours, the supernatants discarded, the plates washed, and diluted alkaline phosphatase-anti-antibody conjugate added for 2 hours at room temperature. The plates are washed and a phosphatase substrate, e.g., P-Nitrophenyl phosphate (Sigma, St. Louis) is added to each well. Plates are incubated, 3N NaOH is added to each well to stop the reaction, and the OD₄₁₀ values determined using an ELISA reader.

10
15
20

In another identification embodiment, microtiter plates pre-treated with poly-L-lysine are used to bind one of the target cells to each well, the cells are then fixed, e.g. using 1% glutaraldehyde, and the bispecific antibodies are tested for their ability to bind to the intact cell. In addition, FACS, immunofluorescence staining, idiotype specific antibodies, antigen binding competition assays, and other methods common in the art of antibody characterization may be used in conjunction with the present invention to identify preferred quadromas.

25
30

Following the isolation of the quadroma, the bispecific antibodies are purified away from other cell

35

- 131 -

products. This may be accomplished by a variety of protein isolation procedures, known to those skilled in the art of immunoglobulin purification. Means for preparing and characterizing antibodies are well known in the art (See, e.g., *Antibodies: A Laboratory Manual, 1988).

For example, supernatants from selected quadromas are passed over protein A or protein G sepharose columns to bind IgG (depending on the isotype). The bound antibodies are then eluted with, e.g. a pH 5.0 citrate buffer. The elute fractions containing the BsAbs, are dialyzed against an isotonic buffer. Alternatively, the eluate is also passed over an anti-immunoglobulin-sepharose column. The BsAb is then eluted with 3.5 M magnesium chloride. BsAbs purified in this way are then tested for binding activity by, e.g., an isotype-specific ELISA and immunofluorescence staining assay of the target cells, as described above.

Purified BsAbs and parental antibodies may also be characterized and isolated by SDS-PAGE electrophoresis, followed by staining with silver or Coomassie. This is possible when one of the parental antibodies has a higher molecular weight than the other, wherein the band of the BsAbs migrates midway between that of the two parental antibodies. Reduction of the samples verifies the presence of heavy chains with two different apparent molecular weights.

Furthermore, recombinant technology is now available for the preparation of antibodies in general, allowing the preparation of recombinant antibody genes encoding an antibody having the desired dual specificity (Van Duk et al., 1989). Thus, after selecting the monoclonal antibodies having the most preferred binding

- 132 -

characteristics, the respective genes for these antibodies can be isolated, e.g., by immunological screening of a phage expression library (Oi & Morrison, 1986; Winter & Milstein, 1991). Then, through
5 rearrangement of Fab coding domains, the appropriate chimeric construct can be readily obtained.

E. Binding Assays

10 Although the present invention has significant utility in animal and human treatment regimens, it also has many other practical uses. These uses are generally related to the specific binding ability of the bispecific compounds. In that all the compounds of the invention
15 include at least one targeting and binding component, e.g., an antibody, ligand, receptor, or such like, the resultant bispecific construct may be used in virtually all of the binding embodiments that the original antibody, ligand or receptor, etc., may be used. The
20 presence of the coagulant, or other binding regions, does not negate the utility of the first binding regions in any binding assay.

As such, the bispecific coagulating ligands may be
25 employed in standard binding assays, such as in immunoblots, Western blots, and other assays in which an antigen is immobilized onto a solid support matrix, e.g., nitrocellulose, nylon or a combination thereof. They may be employed simply as an "antibody substitute" or may be
30 used to provide a more-specific detection means for use in detecting antigens against which standard secondary reagents cause an unacceptably high background. This is especially useful when the antigens studied are themselves immunoglobulins or other antibodies are used
35 in the procedure, as exemplified below in the case of ELISAs.

- 133 -

The bispecific binding ligands may also be used in conjunction with both fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue blocks in immunohistochemistry; in fluorescent activated cell sorting, flow cytometry or flow microfluorometry; in immunoprecipitation to separate a target antigen from a complex mixture, in which case, due to their potential to form molecular lattices, they may even achieve precipitation without a secondary matrix-coupled reagent; in antigen or cell purification embodiments, such as affinity chromatography, even including, in certain cases, the one-step rapid purification of one or more cell populations at the same time; and in many other binding assays that will be known to those of skill in the art given the information presented herein.

As an example, the bispecific ligands of the invention may be used in ELISA assays. Many types of ELISAs are known and routinely practiced in the art. The bispecific ligands may be employed in any of the binding steps, depending on the particular type of ELISA being performed and the "antigen" (component) to be detected. The ligands could therefore be used to coat the plate, to compete for binding sites, as an antigen to provide a standard curve, as a primary binding ligand, as a secondary binding ligand or even as a tertiary or other binding ligand. The many modes of conducting ELISAs will be known to those of skill in the art, in further light of the exemplary mode discussed below.

In one form of an ELISA, binding targets, generally antibodies themselves, are immobilized onto a selected surface, preferably a surface exhibiting a protein affinity such as the wells of a polystyrene microtiter plate. After washing to remove incompletely adsorbed material, it is desirable to bind or coat the assay plate

- 134 -

wells with a nonspecific protein that is known to be antigenically neutral with regard to the test antisera such as bovine serum albumin (BSA), casein or solutions of milk powder. This allows for blocking of nonspecific adsorption sites on the immobilizing surface and thus reduces the background caused by nonspecific binding of antisera onto the surface.

In these types of ELISAs, generally termed sandwich ELISAs, the plate-bound antibody is used to "trap" the antigen. After binding of the first antibody to the well, coating with a non-reactive material to reduce background, and washing to remove unbound material, the immobilizing surface is contacted with, in the present exemplary embodiment, a test sample containing the antigenic material to be detected and/or titered in a manner conducive to immune complex (antigen/antibody) formation. These embodiments are particularly useful for detecting ligands in clinical samples or biological extracts. The samples are preferably diluted with solutions of BSA, bovine gamma globulin (BGG) and phosphate buffered saline (PBS) and a detergent, e.g. Tween.

The layered antisera is then allowed to incubate for from 2 to 4 hours, at temperatures preferably on the order of 25°C to 37°C. Following incubation, the antisera-contacted surface is washed so as to remove non-immunocomplexed material. A preferred washing procedure includes washing with a solution such as PBS/Tween, or borate buffer.

Following formation of specific immunocomplexes between the bound antigen and the test sample, and subsequent washing, the occurrence and amount of immunocomplex formation may be determined by subjecting

- 135 -

same complex to a secondary specific binding component, which is generally an antibody-based component. In a particular embodiment, the bispecific ligands of the invention are proposed for use in this step. Further
5 specific binding and washing steps are then conducted.

To provide a detecting means, in the present exemplary embodiment, a third antibody is used that is linked to a detectable label, such as an associated
10 enzyme that will generate a color development upon incubating with an appropriate chromogenic substrate. The third, or tertiary, labeled antibody has binding affinity for a component of the bispecific ligand. The ultimate immunocomplex is determined, after appropriate
15 binding and washing steps, by detecting the label, e.g., by incubating with a chromogenic substrate, such as urea and bromocresol purple or 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid [ABTS] and H_2O_2 . Quantification is then achieved by measuring the degree
20 of color generation, e.g., using a visible spectra spectrophotometer.

Using a bispecific coagulating ligand as a secondary detection reagent in conjunction with the type of ELISA
25 described above has distinct advantages. For example, it allows the use of a tertiary, labeled antibody that is specific for a portion of the bispecific ligand that is distinct from the typical antibody constant regions usually targeted. In particular, a tertiary binding
30 ligand that is specific for the coagulant portion (or coagulant binding region) of the bispecific construct may be employed. This novel means of detecting immune complex formation imparts improved specificity, which is particularly useful in sandwich ELISAs where the tertiary
35 antibody may cross-react with, and bind to, the original material used to coat the plate, i.e., the original

- 136 -

antibody, rather than just binding to the intended secondary antibody. By directing the labelled tertiary component to an non-antibody portion, or even to a novel antigen combining region, of a bispecific ligand, the problem of non-specific binding, and unusually high background, will be avoided.

Further practical uses of the bispecific ligands are evident by exploiting their coagulating ability. As all of the proposed compounds are capable of inducing coagulation, they may be employed, e.g., as a control, in any assay that involves coagulation as a component. The presence of the targeting component does not negate the utility of the coagulant in such assays, as each component functions independently of the other.

F. Effective Use of Tissue Factor-Binding Bispecific Antibodies

As mentioned earlier, tissue factor (TF) is one agent capable of initiating blood coagulation. TF is exposed to the blood in vascular damage or following activation by certain cytokines. Available TF then complexes with factor VIIa to initiate the coagulation cascade that ultimately results in fibrin formation.

In one exemplary embodiment, the inventors have synthesized a bispecific antibody with specificity for antigens on tumor vasculature endothelial cells on one antigen combining site and specificity for the extracellular domains of human TF on the other antigen combining site. The antibody with specificity for human TF was previously shown to bind TF with high affinity without interfering with the factor VIIa complexing event or the TF/VIIa activity (Morrissey et al., 1988). Instead of using full length human TF, the inventors used

- 137 -

a truncated form (tTF), which is devoid of the cytoplasmic as well as the transmembrane domain. Truncated TF lacks coagulation inducing activity, while still being able to complex factor VIIa, probably because it is not able to complex with a membrane surface upon which the coagulation-initiation complexes, including Factor X, could assemble.

The mouse model used for analyzing the effectiveness of this tumor vasculature endothelial cell specific targeting construct was a recently established model in which MHC class II antigens, that are absent from the vasculature of normal tissues, are expressed on the tumor vasculature through induction by IFN- γ that is secreted by the tumor cells (Burrows *et al.*, 1992; Burrows & Thorpe, 1993). It has been demonstrated that anti-class II antibody administered intravenously localizes rapidly and strongly to the tumor vasculature (Burrows *et al.*, 1992).

The present inventors herein demonstrate that, in a C1300 (Muy) tumor bearing mouse, the anti-MHC Class II/anti-TF bispecific antibody is able to induce coagulation specifically in the vasculature of the tumor when administered together with tTF. Indeed, intravenous administration of the antibody:tTF complex induced rapid thrombosis of tumor vasculature and complete tumor regressions in 70% of animals. Neither the bispecific antibody alone, nor tTF alone, nor any of the isotype matched control antibodies in the presence or absence of tTF, was able to elicit the same effect. This indicates that the B21-2/10H10 bispecific antibody acts as a "coaguligand" that is capable of bridging target cells and tTF so that tTF can activate factor X and start the coagulation cascade. It also shows the evident success of the coaguligand in treating solid tumors.

- 138 -

G. Pharmaceutical Compositions and Kits

Pharmaceutical compositions of the present invention will generally comprise an effective amount of the
5 bispecific coagulating ligand dissolved or dispersed in a pharmaceutically acceptable carrier or aqueous medium.

The phrases "pharmaceutically or pharmacologically acceptable" refer to molecular entities and compositions
10 that do not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to an animal, or a human, as appropriate. As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal
15 agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, its use in
20 the therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the compositions.

1. Parenteral Formulations

25 The bispecific ligands of the present invention will often be formulated for parenteral administration, e.g., formulated for injection via the intravenous, intramuscular, sub-cutaneous or other such routes,
30 including direct instillation into a tumor or disease site. The preparation of an aqueous composition that contains a tumor-targeted coagulant agent as an active ingredient will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. Typically, such
35 compositions can be prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions; solid forms suitable for

- 139 -

using to prepare solutions or suspensions upon the addition of a liquid prior to injection can also be prepared; and the preparations can also be emulsified.

5 Solutions of the active compounds as free base or pharmacologically acceptable salts can be prepared in water suitably mixed with a surfactant, such as hydroxypropylcellulose. Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and mixtures
10 thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

 The pharmaceutical forms suitable for injectable use
15 include sterile aqueous solutions or dispersions; formulations including sesame oil, peanut oil or aqueous propylene glycol; and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases the form must be
20 sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi.

25 The bispecific ligands or antibodies can be formulated into a composition in a neutral or salt form. Pharmaceutically acceptable salts, include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the
30 protein) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for
35 example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric

- 140 -

hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like.

The carrier can also be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the active ingredient plus any additional

- 141 -

desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

Upon formulation, solutions will be administered in a manner compatible with the dosage formulation and in such amount as is therapeutically effective. Formulations are easily administered in a variety of dosage forms, such as the type of injectable solutions described above, but drug release capsules and the like can also be employed.

Suitable pharmaceutical compositions in accordance with the invention will generally include an amount of the bispecific ligand admixed with an acceptable pharmaceutical diluent or excipient, such as a sterile aqueous solution, to give a range of final concentrations, depending on the intended use. The techniques of preparation are generally well known in the art as exemplified by Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed. Mack Publishing Company, 1980, incorporated herein by reference. It should be appreciated that endotoxin contamination should be kept minimally at a safe level, for example, less than 0.5 ng/mg protein. Moreover, for human administration, preparations should meet sterility, pyrogenicity, general safety and purity standards as required by FDA Office of Biological Standards.

The therapeutically effective doses are readily determinable using an animal model, as shown in the studies detailed herein (see, e.g., Example III). Experimental animals bearing solid tumors are frequently used to optimize appropriate therapeutic doses prior to translating to a clinical environment. Such models are known to be very reliable in predicting effective anti-cancer strategies. For example, mice bearing solid

- 142 -

tumors, such as used in Example III, are widely used in pre-clinical testing.

5 The inventors have used mice with C1300 (Mo8) tumors to determine toxicity limits and working ranges of bispecific that give optimal anti-tumor effects with minimal toxicity.

10 It is currently proposed that effective doses for use in the treatment of cancer will be between about 0.1 mg/kg and about 2 mg/kg, and preferably, of between about 0.8 mg/kg and about 1.2 mg/kg, when administered via the IV route at a frequency of about 1 time per week. Some variation in dosage will necessarily occur depending on
15 the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject. Such optimization and adjustment is routinely carried out in the art and by no means reflects an undue
20 amount of experimentation.

It should be remembered that one aspect of the present invention concerns the delivery of a coagulating agent to a tumor site by administering an uncomplexed
25 bispecific binding ligand that garners an endogenous coagulation factor from the circulation and concentrates it within the tumor site. In these cases, the pharmaceutical compositions employed will contain a ligand having a targeting and coagulant binding region,
30 but will otherwise generally be the same as those described above.

In addition to the compounds formulated for parenteral administration, such as intravenous or
35 intramuscular injection, other pharmaceutically acceptable forms are also contemplated, e.g., tablets or

- 143 -

other solids for oral administration, time release capsules, liposomal forms and the like. Other pharmaceutical formulations may also be used, dependent on the condition to be treated. For example, topical formulations that are appropriate for treating pathological conditions such as dermatitis and psoriasis; and ophthalmic formulations for diabetic retinopathy.

2. Ingestible Formulations

10

In certain embodiments, active compounds may be administered orally. This is contemplated for agents that are generally resistant, or have been rendered resistant, to proteolysis by digestive enzymes. Such compounds are contemplated to include chemically designed or modified agents; dextrorotatory peptidyl agents; liposomal formulations; and formulations in time release capsules to avoid peptidase and lipase degradation.

20

For oral administration, the active bispecific compounds may be administered, for example, with an inert diluent or with an assimilable edible carrier, or they may be enclosed in hard or soft shell gelatin capsule, or compressed into tablets, or incorporated directly with the food of the diet. For oral therapeutic administration, the active compounds may be incorporated with excipients and used in the form of ingestible tablets, buccal tables, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers, and the like. Such compositions and preparations should contain at least 0.1% of active bispecific coagulant. The percentage of the compositions and preparations may, of course, be varied and may conveniently be between about 2 to about 60% of the weight of the unit. The amount of active compounds in such therapeutically useful compositions is such that a suitable dosage will be obtained.

- 144 -

The tablets, troches, pills, capsules and the like may also contain the following: a binder, as gum tragacanth, acacia, cornstarch, or gelatin; excipients, such as dicalcium phosphate; a disintegrating agent, such as corn starch, potato starch, alginic acid and the like; a lubricant, such as magnesium stearate; and a sweetening agent, such as sucrose, lactose or saccharin may be added or a flavoring agent, such as peppermint, oil of wintergreen, or cherry flavoring. When the dosage unit form is a capsule, it may contain, in addition to materials of the above type, a liquid carrier.

Various other materials may be present as coatings or to otherwise modify the physical form of the dosage unit. For instance, tablets, pills, or capsules may be coated with shellac, sugar or both. A syrup or elixir may contain the active compounds sucrose as a sweetening agent methyl and propylparabens as preservatives, a dye and flavoring, such as cherry or orange flavor. Of course, any material used in preparing any dosage unit form should be pharmaceutically pure and substantially non-toxic in the amounts employed. In addition, the active compounds may be incorporated into sustained-release preparation and formulations.

3. Liposomal Formulations

The bispecific coagulating ligands of the present invention may also be formulated in liposomal preparations if desired. The following information may be utilized in generating liposomal formulations incorporating the present coagulants. Phospholipids form liposomes when dispersed in water, depending on the molar ratio of lipid to water. The physical characteristics of liposomes depend on pH, ionic strength and the presence of divalent cations. Liposomes can show low permeability

- 145 -

to ionic and polar substances, but at elevated temperatures undergo a phase transition which markedly alters their permeability. The phase transition involves a change from a closely packed, ordered structure, known as the gel state, to a loosely packed, less-ordered structure, known as the fluid state. This occurs at a characteristic phase-transition temperature and results in an increase in permeability to ions, sugars and drugs.

10 In addition to temperature, exposure to proteins can alter the permeability of liposomes. Certain soluble proteins such as cytochrome c bind, deform and penetrate the bilayer, thereby causing changes in permeability. Cholesterol inhibits this penetration of proteins, 15 apparently by packing the phospholipids more tightly. It is contemplated that the most useful liposome formations for use with the present invention will contain cholesterol, or even PEG.

20 The ability to trap solutes varies between different types of liposomes. For example, multilamellar vesicles (MLVs) are moderately efficient at trapping solutes, but small unilamellar vesicles (SUVs) are inefficient. SUVs offer the advantage of homogeneity and reproducibility in size distribution, however, and a compromise between size and trapping efficiency is offered by large unilamellar vesicles (LUVs). These are prepared by ether evaporation 25 and are three to four times more efficient at solute entrapment than MLVs.

30 In addition to liposome characteristics, an important determinant in entrapping compounds is the physicochemical properties of the compound itself. Polar compounds are trapped in the aqueous spaces and nonpolar compounds bind to the lipid bilayer of the vesicle. 35 Polar compounds are released through permeation or when

- 146 -

the bilayer is broken, but nonpolar compounds remain affiliated with the bilayer unless it is disrupted by temperature or exposure to lipoproteins. Both types show maximum efflux rates at the phase transition temperature.

5

Liposomes interact with cells via four different mechanisms: Endocytosis by phagocytic cells of the reticuloendothelial system such as macrophages and neutrophils; adsorption to the cell surface, either by nonspecific weak hydrophobic or electrostatic forces, or by specific interactions with cell-surface components; fusion with the plasma cell membrane by insertion of the lipid bilayer of the liposome into the plasma membrane, with simultaneous release of liposomal contents into the cytoplasm; and by transfer of liposomal lipids to cellular or subcellular membranes, or vice versa, without any association of the liposome contents. It often is difficult to determine which mechanism is operative and more than one may operate at the same time.

20

The fate and disposition of intravenously injected liposomes depend on their physical properties, such as size, fluidity and surface charge. They may persist in tissues for hours or days, depending on their composition, and half lives in the blood range from minutes to several hours. Larger liposomes, such as MLVs and LUVs, are taken up rapidly by phagocytic cells of the reticuloendothelial system, but physiology of the circulatory system restrains the exit of such large species at most sites. They can exit only in places where large openings or pores exist in the capillary endothelium, such as the sinusoids of the liver or spleen. Thus, these organs are the predominate site of uptake. On the other hand, SUVs show a broader tissue distribution but still are sequestered highly in the liver and spleen. In general, this *in vivo* behavior

35

- 147 -

dictates that liposomes concentrate only in those organs and tissues accessible to their large size. As this clearly includes the blood, this is not a limitation to their combined use with the present invention.

5

In other embodiments, the bispecific components of the invention may be admixed with the liposome surface to direct the drug contents to the specific antigenic receptors located on the target cell surface.

10 Carbohydrate determinants (glycoprotein or glycolipid cell-surface components that play a role in cell-cell recognition, interaction and adhesion) may also be used as recognition sites as they have potential in directing liposomes to particular cell types. Mostly, it is
15 contemplated that intravenous injection of liposomal preparations would be used, but other routes of administration are also conceivable.

4. Topical Formulations

20

The formulation of bispecific coagulants for topical use, such as in creams, ointments and gels is also contemplated. The preparation of oleaginous or water-soluble ointment bases is also well known to those in the
25 art. For example, these compositions may include vegetable oils, animal fats, and more preferably, semisolid hydrocarbons obtained from petroleum. Particular components used may include white ointment, yellow ointment, cetyl esters wax, oleic acid, olive oil,
30 paraffin, petrolatum, white petrolatum, spermaceti, starch glycerite, white wax, yellow wax, lanolin, anhydrous lanolin and glyceryl monostearate.

Various water-soluble ointment bases may also be
35 used, including glycol ethers and derivatives, polyethylene glycols, polyoxyl 40 stearate and

- 148 -

polysorbates. Even delivery through the skin may be employed if desired, e.g., by using transdermal patches, iontophoresis or electrotransport.

5 **5. Ophthalmic Formulations**

 The bispecific coagulating ligands of the present invention may also be formulated into pharmaceutical compositions suitable for use as ophthalmic solutions.
10 Such ophthalmic solutions are of interest, for example, in the treatment of diabetic retinopathy. Thus, for the treatment of diabetic retinopathy a bispecific conjugate of this invention would be administered to the eye of the subject in need of treatment in the form of an ophthalmic
15 preparation prepared in accordance with conventional pharmaceutical practice, see for example "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1488 to 1501 (Mack Publishing Co., Easton, PA).

20 The ophthalmic preparation will contain a novel bispecific coagulant or a pharmaceutically acceptable salt thereof in a concentration from about 0.01 to about 1% by weight, preferably from about 0.05 to about 0.5% in a pharmaceutically acceptable solution, suspension or
25 ointment. Some variation in concentration will necessarily occur, depending on the particular compound employed, the condition of the subject to be treated and the like, and the person responsible for treatment will determine the most suitable concentration for the
30 individual subject. The ophthalmic preparation will preferably be in the form of a sterile aqueous solution containing, if desired, additional ingredients, for example preservatives, buffers, tonicity agents, antioxidants and stabilizers, nonionic wetting or
35 clarifying agents, viscosity-increasing agents and the like.

- 149 -

Suitable preservatives for use in such a solution include benzalkonium chloride, benzethonium chloride, chlorobutanol, thimerosal and the like. Suitable buffers include boric acid, sodium and potassium bicarbonate, sodium and potassium borates, sodium and potassium carbonate, sodium acetate, sodium biphosphate and the like, in amounts sufficient to maintain the pH at between about pH 6 and pH 8, and preferably, between about pH 7 and pH 7.5. Suitable tonicity agents are dextran 40, dextran 70, dextrose, glycerin, potassium chloride, propylene glycol, sodium chloride, and the like, such that the sodium chloride equivalent of the ophthalmic solution is in the range 0.9 plus or minus 0.2%.

Suitable antioxidants and stabilizers include sodium bisulfite, sodium metabisulfite, sodium thiosulfite, thiourea and the like. Suitable wetting and clarifying agents include polysorbate 80, polysorbate 20, poloxamer 282 and tyloxapol. Suitable viscosity-increasing agents include dextran 40, dextran 70, gelatin, glycerin, hydroxyethylcellulose, hydroxymethylpropylcellulose, lanolin, methylcellulose, petrolatum, polyethylene glycol, polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, carboxymethylcellulose and the like. The ophthalmic preparation will be administered topically to the eye of the subject in need of treatment by conventional methods, for example in the form of drops or by bathing the eye in the ophthalmic solution.

6. Therapeutic Kits

The present invention also provides therapeutic kits comprising the bispecific coagulating ligands described herein. Such kits will generally contain, in suitable container means, a pharmaceutically acceptable formulation of at least one bispecific ligand in

- 150 -

accordance with the invention. The kits may also contain other pharmaceutically acceptable formulations, such as those containing additional bispecific coagulating ligands, generally those having a distinct targeting component; extra uncomplexed coagulation factors; bispecific antibodies, T cells, or other functional components for use in, e.g., antigen induction; components for use in antigen suppression, such as a cyclosporin; distinct anti-tumor site antibodies or immuntoxins; and any one or more of a range of chemotherapeutic drugs.

Preferred agents for use in combination kits are inducing agents capable of inducing disease-associated vascular endothelial cells to express a targetable antigen, such as E-selectin or an MHC Class II antigen. Inducing agents can include T cell clones that bind disease or tumor antigens and that produce IFN- γ . Preferred inducing agents include bispecific antibodies that bind to disease or tumor cell antigens and to effector cells capable of inducing target antigen expression through the elaboration of cytokines.

As such, the present invention further includes kits that comprise, in suitable container means, a first pharmaceutical composition comprising a bispecific antibody that binds to an activating antigen on an effector cell surface, i.e., a monocyte/ macrophage, mast cell, T cell or NK cell, and to an antigen on the cell surface of disease cell; and a second pharmaceutical composition comprising a bispecific ligand that comprises a first binding region that binds to an endothelial cell antigen induced by an activated effector cell, or cytokine therefrom, where the first binding region is operatively linked to a coagulation factor or a second binding region that binds to a coagulation factor.

- 151 -

Kits including a first pharmaceutical composition that comprises a bispecific antibody that binds to the activating antigen CD14, CD16 (FcR for IgE), CD2, CD3, CD28 or the T-cell receptor antigen are preferred, with
5 CD14 or CD28 binding bispecific antibodies being more preferred. Activation of monocyte/macrophages or mast cells via CD14 or CD16 binding results in IL-1 production that induces E-selectin; whereas activation of T cells via CD2, CD3 or CD28 binding results in IFN- γ production
10 that induces MHC class II. Kits that include a second pharmaceutical composition that comprises a bispecific ligand that comprises a first binding region that binds to E-selectin or to an MHC Class II antigen are therefore also preferred.

15

The kits may have a single container means that contains the bispecific coagulating ligand, with or without any additional components, or they may have distinct container means for each desired agent. Kits
20 comprising the separate components necessary to make a bispecific coagulating ligand are also contemplated.

When the components of the kit are provided in one or more liquid solutions, the liquid solution is an
25 aqueous solution, with a sterile aqueous solution being particularly preferred. However, the components of the kit may be provided as dried powder(s). When reagents or components are provided as a dry powder, the powder can be reconstituted by the addition of a suitable solvent.
30 It is envisioned that the solvent may also be provided in another container means.

The container means of the kit will generally include at least one vial, test tube, flask, bottle,
35 syringe or other container means, into which the bispecific coagulating ligand, and any other desired

- 152 -

agent, may be placed and, preferably, suitably aliquoted. Where additional components are included, the kit will also generally contain a second vial or other container into which these are placed, enabling the administration of separated designed doses. The kits may also comprise a second/third container means for containing a sterile, pharmaceutically acceptable buffer or other diluent.

The kits may also contain a means by which to administer the bispecific ligand to an animal or patient, e.g., one or more needles or syringes, or even an eye dropper, pipette, or other such like apparatus, from which the formulation may be injected into the animal or applied to a diseased area of the body. The kits of the present invention will also typically include a means for containing the vials, or such like, and other component, in close confinement for commercial sale, such as, e.g., injection or blow-molded plastic containers into which the desired vials and other apparatus are placed and retained.

The following examples are included to demonstrate preferred embodiments of the invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples that follow represent techniques discovered by the inventors to function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments that are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

35

- 153 -

EXAMPLE I

SYNTHESIS OF A BISPECIFIC COAGULATING ANTIBODY

The present example describes the synthesis of a
5 bispecific antibody capable of specifically directing a
coagulant to a tumor site, i.e., a "coaguligand".

A. Materials and Methods10 1. Reagents

Pepsin (A; EC 3.4.23.1), Ellmans reagent (ER;
5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid, DNTB),
2-mercaptoethanol (2-ME), sodium arsenite (NaAsO₂) and
15 rabbit brain thromboplastin (acetone powder) were
obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis MO. Sephadex
G-25 and G-100 were obtained from Pharmacia LKB
(Piscataway, NJ).

20 2. Human Truncated Tissue Factor (tTF)

Recombinant human truncated TF (tTF) was prepared by
one of two different methods.

25 Method I: Construction of the *E. coli* Expression Vector.
The cDNA coding for tTF (residues 1-218) was amplified by
PCR using the primers

5'-GAAGAAGGGATCCTGGTGCCTCGTGGTTCTGGCACTACAAATACT-3'

(5'-primer; SEQ ID NO:28) and

30 5'-CTGGCCTCAAGCTTAACGGAATTCACCTTT-3' (3'-primer; SEQ ID
NO:29) which allowed the addition of the coding sequence
for a thrombin cleavage site upstream of the cDNA. The
PCR products were cleaved using BamHI and HindIII and
ligated between the BamHI and HindIII sites of the
35 expression vector pTrcHisC (Invitrogen).

- 154 -

DH5 α cells were transformed with the ligation mixture and recombinant plasmids were isolated after selection in the presence of ampicillin. The *E. coli* strain BL21 was transformed with the recombinant plasmid pTrcHisC-tTF and the resultant transformants were used for protein expression.

Method I: Expression, Refolding and Purification of tTF from *E. coli*. The poly(his)-tTF fusion protein was expressed using BL21 cells transformed with pTrc-HisC-tTF. Inoculant cultures (10 ml in LB medium) were grown overnight shaking at 37°C.

Inoculant cultures were added to growth medium which were then grown shaking at 37°C. When the optical density at 550 nm had reach ca. 0.5, 10 ml of 100 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside was added. Shaking was continued at 37°C for ca. 20 h (to stationary phase).

The cells were harvested by centrifugation (10,000 x g, 20 min.) and the inclusion bodies were isolated as follows (quantities of reagents are per gram of cell paste). The cell paste was suspended in 4 ml of 10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.17 mg/ml PMSF, 2 mg/ml hen egg white lysozyme (Sigma). Benzonase (250 units, EM Science) was added the suspension was mixed gently at room temperature for 1.5 h then centrifuged at 12,000 g for 15 min.

The pellet was resuspended in 10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 3% NP40 (2 ml), sonicated for 1 min at 50% power and centrifuged at 12,000 x g for 20 min. The pellet was resuspended in water, sonicated for 20-30 seconds at 50% power and centrifuged at 12,000 x g for 20 min. The water wash was repeated and the final pellet, highly enriched for the inclusion bodies, was suspended in 6 M

- 155 -

guanidinium chloride, 0.5 M NaCl, 20 mM phosphate, 10 mM β -mercaptoethanol, pH 8.0 (9 ml per gram of inclusion bodies) by gentle mixing at room temperature overnight.

5 The suspension was centrifuged at 12,000 x g for 20 min and the supernatant was loaded onto a nickel nitriloacetic acid (Ni-NTA, Qiagen) column. The column was washed successively with the same 6 M guanidinium chloride buffer at pH 8 then pH 7, then the protein was
10 eluted by decreasing the pH to 4.

 Ni-NTA column fractions containing the fusion protein were combined and dithiothreitol was added to 50 mM. The solution was held at room temperature overnight
15 then diluted to a protein concentration of ca. 1 mg/ml in 6 M urea, 50 mM Tris, 0.02% sodium azide, pH 8.0 and dialyzed at 4°C overnight against 10-20 volumes of the same buffer. The buffer was changed to 2 M urea, 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 2.5 mM reduced glutathione, 0.5 mM
20 oxidized glutathione, 0.02% sodium azide, pH 8.0 (folding buffer). Dialysis was continued for 2 more days, the buffer was replaced by fresh folding buffer and dialysis was continued for 2 more days.

25 The solution was then dialyzed extensively against 20 mM TEA (pH 7.5), removed from the dialysis bag, treated with human thrombin (ca. 1 part per 500 parts recombinant protein w/w) overnight at room temperature, and loaded onto a HR-10/10 mono-Q anion exchange column.
30 tTF protein was eluted using a 20 mM TEA buffer containing NaCl in a concentration increasing linearly from 0 to 150 mM over 30 minutes (flow rate 3 ml/min).

Method II: Preparation of tTF complimentary DNA (cDNA).
35 RNA from J-82 cells (human bladder carcinoma) was used for the cloning of tTF. Total RNA was isolated using the

- 156 -

GlassMaxTM RNA microisolation reagent (Gibco BRL). The RNA was reverse transcribed to cDNA using the GeneAmp RNA PCR kit (Perkin Elmer). tTF cDNA was amplified using the same kit with the following two primers:

5

5' primer: 5' GTC ATG CCA TGG CCC TGG TGC CTC GTG CTCTG GCA CTA CAA ATA CT

10

3' primer: 5' TGA CAA GCT TAT TCT CTG AAT TCC CCC TTT CT
(SEQ ID NO:2)

The underlined sequences codes for the N-terminus and C-terminus of tTF. The rest of the sequence in the 5' primer is the restriction site for NcoI allowing the cloning of tTF into the expression vector and codes for a cleavage site for thrombin. The sequence in the 3' primer is the HindIII site for cloning tTF into the expression vector. PCR amplification was performed as suggested by the manufacturer. Briefly, 75 μ M dNTP; 0.6 μ M primer, 1.5 mM MgCl₂ were used and 30 cycles of 30" at 95°C, 30" at 55°C and 30" at 72°C were performed.

Method II. Vector Constructs. *E. coli* expression vector H₆ pQE-60 was used for expressing tTF (Lee et. al., 1994). The PCR amplified tTF cDNA was inserted between the NcoI and HindIII site. H₆ pQE-60 has a built-in (His)₆ encoding sequence such that the expressed protein has the sequence of (His)₆ at the N-terminus, which can be purified on the Ni-NTA column.

30

Method II. tTF Purification. tTF containing H₆ pQE-60 DNA was transformed to *E. coli* TG-1 cells. The cells were grown to OD₆₀₀ = 0.5 and IPTG was added to 30 μ M to induce the tTF production. The cells were harvested after shaking for 18 h at 30°C. The cell pellet was denatured in 6 M Gu-HCl and the lysate was loaded onto a

35

- 157 -

Ni-NTA column (Qiagen). The bound tTF was washed with 6 M urea and tTF was refolded with a gradient of 6 M - 1 M urea at room temperature for 16 h. The column was washed with wash buffer (0.05 Na H₂ PO₄, 0.3 M NaCl, 10% glycerol) and tTF was eluted with 0.2 M Imidazole in wash buffer.

The eluted tTF was concentrated and loaded onto a G-75 column. tTF monomers were collected and treated with thrombin to remove the H₆ peptide. This was done by adding 1 part of thrombin (Sigma) to 500 parts of tTF (w/w), and the cleavage was carried out at room temperature for 18 h. Thrombin was removed from tTF by passage of the mixture through a Benzamidine Sepharose 6B thrombin affinity column (Pharmacia).

The tTF had identical ability to recombinant tTF from yeast or Chinese hamster ovary cells to bind factor VIIa and to enhance the catalytic activity of VIIa (Ruf et al., 1991). When analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate, it ran as a single component having a molecular weight of approximately 24 kD.

3. Monoclonal Antibodies

B21-2 (TIB-229) hybridoma and SFR8-B6 hybridoma (HB-152, hereafter referred to as SFR8) were obtained from the ATCC. Both hybridomas secreted rat IgG2b antibodies, which were purified from culture supernatant by protein G affinity chromatography. The B21-2 antibody reacts with I-A^d antigen expressed on A20 cells as well as on the vasculature of the C1300 (Muγ) transfectant tumors grown in BALB/c/nu/nu mice. SFR8 antibody is directed against the HLA-Bw6 epitope and serves as an isotype matched negative control for the B21-2 antibody.

- 158 -

TF9/10H10 (referred to as 10H10), a mouse IgG1, is reactive with human TF without interference of TF/factor VIIa activity and was produced as described by Morrissey *et al.* (1988).

5

The cell line MRC OX7 (referred to as OX7) was obtained from Dr. A. F. Williams (MRC Cellular Immunology Unit, University of Oxford, Oxford, England). It secretes the OX7 antibody, a mouse IgG1 antibody that recognizes the Thy 1.1 antigen on T lymphocytes. It was used as an isotype matched negative control for TF9/10H10.

All antibodies were purified from culture supernatant by protein G affinity chromatography.

4. Synthesis of Bispecific Antibodies

F(ab')₂ fragments were obtained by digesting their respective IgGs with 2% (w/v) pepsin for 5-9 hrs at 37 °C and purification of the fragments by Sephadex G100 chromatography. Synthesis of the bispecific antibodies B21-2/10H10, SFR8/10H10 and B21-2/OX7 was carried out according to the method of Brennan *et al.* (1985) with minor modifications.

The bispecific antibodies B21-2/10H10, SFR8/10H10, OX7/10H10 and B21-2/OX7 were synthesized according to the method of Brennan *et al.* (1985) with minor modifications. In brief, F(ab')₂ fragments were obtained from the IgG antibodies by digestion with pepsin and were purified to homogeneity by chromatography Sephadex G100. F(ab')₂ fragments were reduced for 16 h at 20°C with 5mM 2-mercaptoethanol in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing 1 mM EDTA (PBSE buffer) and 9 mM NaAsO₂. Ellman's reagent (ER) was added to give a final

- 159 -

concentration of 25 mM and, after 3 h at 20°C, the Ellman's-derivatized Fab' fragments (Fab'-ER) were separated from unreacted ER on columns of Sephadex G25 in PBSE.

5

To form the bispecific antibody, Fab'-ER derived from one antibody was concentrated to approximately 2.5 mg/ml in an ultrafiltration cell and was reduced with 10 mM 2-mercaptoethanol for 1 h at 20°C. The resulting Fab'-SH was filtered through a column of Sephadex G25 in PBSE and was mixed with equal molar quantities of Fab'-ER prepared from the second antibody. The mixtures were concentrated by ultrafiltration to approximately 3 mg/ml and were stirred for 16 h at 20°C. The products of the reaction were fractionated on columns of Sephadex G100 and the fractions containing the bispecific antibody (110 kDa) were concentrated to 1 mg/ml, and were stored at 4°C in 0.02% sodium azide.

20 B. Results

1. Analysis of Bispecific Antibodies

The molecular weight of the $F(ab')_2$ fragments and bispecific preparations were determined by SDS-Page electrophoresis with 4-15% gradient gels using the Pharmacia LKB-Phastsystem (Pharmacia LKB, Piscataway, NJ). Bispecificity as well as the percentage of heterodimer vs homodimer was determined by FACS analysis (Example II).

Analysis of the bispecific antibodies by SDS-Page electrophoresis (and by FACS, Example II) demonstrated that the B21-2/10H10 bispecific contained less than 4% homodimer of either origin and < 10% fragments with a molecular weight of 140 kD or 55 kD. Approximately 10%

- 160 -

of the preparation consisted of 140 kD fragments, probably being a $F(ab')_2$ construct with an extra light chain (of either origin) attached.

5

EXAMPLE II

COAGULATING ANTIBODY BINDING AND FUNCTION IN VITRO

The present example shows the bispecificity of the coagulating antibody (coaguligand) and demonstrates that specific binding, cellular delivery and coagulation is achieved *in vitro* using the coaguligand.

A. Materials and Methods

15 1. Cells

The A20 cell line, which is an I-A^d positive BALB/c B-cell lymphoma, was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD; TIB-208). A20 cells were grown in DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), 0.2 mM L-glutamine, 200 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, 18 mM Hepes, 0.1 mM non-essential amino acids mix and 1mM sodium pyruvate (medium hereafter referred to as complete DMEM; all reagents obtained from Life Technologies, Gaithersburg, MD). 2-ME is added to complete DMEM to a final concentration of 0.064 mM for A20 cells. Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 90% air/10% CO₂.

30

J82, a human gall bladder carcinoma expressing TF, was obtained from the ATCC (HTB-1). The cells grew adherently in complete DMEM.

35

The C1300 neuroblastoma cell line was established from a spontaneous tumor, which arose in an A/Jax mouse

- 161 -

(Dunham & Stewart, 1953). The C1300 (Mu γ) 12 line, hereafter referred to as C1300 (Mu γ) was derived by transfection of C1300 neuroblastoma cells with the murine IFN-- γ gene using the IFN- γ expression retrovirus pSVX (Mu γ Δ As) (Watanabe et al., 1989). The IFN- γ expression retrovirus was obtained from Dr. Y. Watanabe (Department of Molecular Microbiology, Kyoto University, Japan).

C1300 (Mu γ) 12 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), 2.4 mM L-glutamine, 200 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 100 μ M nonessential amino acids, 1 μ M sodium pyruvate, 18 μ M HEPES and 1 mg/ml G418 (Geneticin; Sigma). Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 90% air/10% CO₂.

The Thy 1.1-expressing AKR-A mouse T lymphoma cell line was obtained from Prof. Dr. I. MacLennan (Department of Experimental Pathology, Birmingham University, Birmingham, England) and were grown in complete DMEM.

2. Indirect immunofluorescence

A20 cells were resuspended in PBS/0.2% BSA/0.02% Na-azide (hereafter referred to as FACS buffer) at 4 x 10⁶ cells/ml. J82 cells were released from the flask under mild conditions using PBS/EDTA (0.2 % w/v) and resuspended at 4 x 10⁶ cells/ml in FACS buffer. 50 μ l of cell suspension was added to 50 μ l of optimal serial dilutions of the primary antibody in wells of a round-bottomed 96 well plate. After incubation at RT for 15 min, the cells were washed with FACS buffer 3 times. After removing the final supernatant, 50 μ l of the secondary antibody conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC), in a 1 in 20 dilution in FACS buffer, was added to the cells. The cells were incubated

- 162 -

for a further 15 min at RT and washed 3 times with FACS buffer. Cell associated fluorescence was measured on a FACScan (Becton Dickenson, Fullerton, CA). Data were analyzed using the Lysis II program. When FITC-anti-rat immunoglobulin was used as the secondary antibody, normal mouse serum (10% v/v) was added to block non-specific cross reactivity with the mouse cells.

3. Radiolabeling of Proteins

10

Proteins were labeled with ^{125}I Iodine according to the chloramine T protocol described by Mason & Williams (1980), (protocol 2). The iodinated product was purified on G25 and stored at -70°C in the presence of 5% DMSO and 5 mg/ml bovine IgG in the case of the monoclonal fragments and 5% DMSO and 5 mg/ml BSA in the case of tTF. Specific activity ranged between $2.5\ \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ and $4.8\ \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

20 4. Binding studies

Human tTF was labelled with ^{125}I to a specific activity of $2.5\text{-}4.8\ \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ using the chloramine T procedure (Protocol 2) described by Mason and Williams (1980). A suspension of A20 cells at 2×10^6 cells/ml in PBS containing 2 mg/ml BSA and 0.02% sodium azide was distributed in 50 μl volumes into the wells of 96 well round-bottomed microtiter plates. To the wells were added 25 μl of bispecific antibodies prepared over a range of concentrations (8 to $0.02\ \mu\text{g}/\text{ml}$) in the same buffer.

25 μl of ^{125}I -tTF at $8\ \mu\text{g}/\text{ml}$ in the same buffer were added to each well, giving a molar excess of tTF. The plates were shaken and incubated for 1 hr at 4°C . The cells were then washed 3x in the plates with 0.9% (w/v)

- 163 -

NaCl containing 2 mg/ml BSA. The contents of the wells were pipetted over a 10:11 (v/v) mixture of dibutyl phthalate and bis(2-ethylhexyl)phthalate oils in microcentrifuge tubes. The tubes were centrifuged for 5 1.5 min at 7500 g and were snap frozen in liquid nitrogen. The tips containing the cells were cut off. The radioactivity in the cell pellet and in the supernatant was measured in a gamma counter.

10 5. Coagulation Assay

An identical microplate to that used for the binding assay above was set up on the same occasion, except that non-labelled tTF was added instead of ^{125}I -tTF. After 15 the 1h incubation at 4°C, the cells were washed 3x as before and were resuspended in 75 μl of 0.9% NaCl containing 2 mg/ml BSA and 12.5 mM CaCl_2 . The contents of the wells were transferred to 5 ml clear plastic tubes and were warmed to 37°C. To each tube was added 30 μl of 20 citrated mouse plasma at 37°C. The time for the first fibrin strands to form was recorded.

B. Results

25 1. Antibody Bispecificity

For SFR8/10H10 bispecificity was shown by FACS using J82 cells (TF positive) as target cells and FITC-anti-mouse immunoglobulin to demonstrate 10H10 30 presence. FITC-anti-rat immunoglobulin was used to demonstrate the presence of SFR8. The mean fluorescence intensity-versus-concentration curves were coincident for both stains, demonstrating that both the mouse and the rat arm are present in the bispecific preparation.

35

- 164 -

2. Antibody Binding

Binding studies with 125 Iodine labeled B21-2 Fab' and SFR8 Fab' showed that the concentration at which saturation of binding of B21-2 Fab' to A20 cells is reached is 21.5 nM. The SFR8 Fab' bound non-specifically to A20 cells, with the number of molecules bound per cell being less than 50,000 at 21.5 nM versus 530,000 for B21-2 Fab'.

3. Coagulant Delivery and Tethering

To study the capability of bridging tTF to A20 cells through the B21-2/10H10 bispecific antibody as compared to the control bispecific antibodies, A20 cells were incubated with bispecific antibody and a 125 I-tTF concentration range as indicated. Saturation was attained at concentrations of bispecific antibody of 10 nM (1 μ g/ml) or more, when an average of 310,000 molecules of tTF were bound to each A20 cell. The binding was specific since no tTF binding was mediated by either of the isotype-matched control bispecific antibodies, SFR8/10H10 or B21-2/OX7, which had only one of the two specificities needed for tethering tTF (FIG. 1).

4. Coagulation

To investigate whether tTF bound to A20 cells through a bispecific antibody was able to induce coagulation, the inventors first incubated A20 cells with 21.5 nM bispecific antibody and 69 nM tTF. The resulting effect on the coagulation time is shown in Table VII. These first studies showed that A20 cells coated with a complex of B21-2/10H10 and tTF were capable of inducing fibrin formation: it shortened coagulation time from

- 165 -

140 sec (the time for mouse plasma in CaCl_2 to coagulate in the absence of added antibodies or TF under the specific conditions used) to 60 sec. In contrast, the control bispecific antibodies did not induce activation of coagulation: in these cases coagulation time was 140 sec.

Later studies confirmed and extended the initial results. Mouse plasma added to A20 cells to which tTF had been tethered with B21-2/10H10 coagulated rapidly. Fibrin strands were visible 36 seconds after adding the plasma as compared with 164 seconds in plasma added to untreated A20 cells (Table VII). Only when tTF had been tethered to the cells was coagulation induced: no effect on coagulation time was seen with cells incubated with of tTF alone, homodimeric F(ab')_2 , Fab' fragments or bispecific antibodies having only one of the two specificities needed for tethering tTF.

A linear relationship existed between the logarithm of the average number of tTF molecules tethered to each A20 cell and the rapidity with which those cells induced coagulation of mouse plasma (FIG. 2). Cells bearing 300,000 molecules of tTF per cell induced coagulation in 40 secs but even with 20,000 molecules per cell coagulation was significantly faster (140 secs) than it was with untreated cells (190 secs).

- 166 -

Table VII. Coagulation of mouse plasma induced by tethering tTF to A20 cells with bispecific antibody.

	Reagents added ¹	Coagulation time ² (sec)
	None	164 ± 4
5	B21-2/10H10 + tTF	36 ± 2
	B21-2/10H10	163 ± 2
	tTF	163 ± 3
	B21-2/OX7 + tTF	165 ± 4
	SFR8/10H10 + tTF	154 ± 5
10	10H10 F(ab') ₂ + tTF	160 ± 3
	10H10 Fab' + tTF	162 ± 2
	B21-2 F(ab') ₂ + tTF	168 ± 4
	B21-2 Fab' + tTF	165 ± 4

15

¹Bispecific antibodies F(ab')₂ and Fab' fragments (0.33 µg/10⁵ cells/100 µl) and tTF (0.17 µg/10⁵ cells/100 µl) were incubated with A20 cells for 1h at 4°C in 0.2% w/v sodium azide. The cells were washed, warmed to 37°C, calcium and plasma were added and the time for the first fibrin strands to form was recorded.

20

²Arithmetic mean of triplicate determinations ± standard deviation

25

- 167 -

EXAMPLE III

SPECIFIC TUMOR VASCULATURE SPECIFIC COAGULATION IN VIVO

The present example describes the specific
5 coagulation of tumor vasculature *in vivo* that results
following the administration of the bispecific antibody
coaguligand as a delivery vehicle for human tissue
factor.

10 A. Materials and Methods1. Reagents

15 Mouse blood was obtained by heartpuncture and
collected in 1/10 volume of 3.8% buffered citrate. The
blood was centrifuged for 10 min at 3000g and the plasma
snap frozen in small aliquots and stored at - 70 °C.

2. Animals

20

BALB/c nu/nu mice were obtained from Simonsen
(Gilroy, CA) and maintained under SPF conditions.

3. C1300 (Muy) Mouse Model and Treatment

25

The tumor model was as previously described (Burrows
et al., 1992; Burrows & Thorpe, 1993) with three
refinements. First, a different antibody, B21-2, was
used. This antibody recognizes I-A^d but not I-E^d, unlike
30 the previously used M5/114 antibody which recognizes both
molecules. The B21-2 antibody has an approximately 10-
fold better affinity than M5/114. Second, a subline of
the previously used C1300(Muy)12 line was used which grew
continuously in BALB/c nu/nu mice. The C1300(Muy) 12
35 cells used previously had to be mixed with untransfected
C1300 cells in order to form continuously growing tumors.

- 168 -

The new subline, designated C1300 (Muγ) t1P3, will be referred to hereafter as C1300 (Muγ). Third, it was unnecessary to add tetracycline to the mice's drinking water to prevent gut bacteria from inducing I-A^d on the gastrointestinal epithelium. Unlike immunotoxins, coaguligands do not damage I-A^d-expressing intestinal epithelium.

For establishment of solid tumors, 1.5×10^7 C1300 (Muγ) cells were injected subcutaneously into the right anterior flank of BALB/c nu/nu mice. When the tumors had grown to 0.8 cm in diameter, mice were randomly assigned to different treatment groups each containing 7-8 mice.

Coaguligands were prepared by mixing bispecific antibodies (140 μg) and tTF (110 μg) in a total volume of 2.5 ml of 0.9% NaCl and leaving them at 4°C for one hour. Mice then received intravenous injections of 0.25 ml of this mixture (i.e. 14 μg of bispecific antibody plus 11 μg of tTF). Other mice received 14 μg of bispecific antibodies or 11 μg of tTF alone. The injections were performed slowly into one of the tail veins over approximately 45 sec and were followed with a second injection of 200 μl of saline into the same vein. This injection procedure was adopted to prevent thrombosis of the tail vein which was seen if mice were rapidly injected (1-2 sec). Seven days later, the treatments were repeated.

Perpendicular tumor diameters were measured at regular intervals and tumor volumes were estimated according to the following equation:

$$\text{volume} = \text{smaller diameter}^2 \times \text{larger diameter} \times \pi/6$$

- 169 -

Differences in tumor volume were tested for statistical significance using the Mann-Whitney-Wilcoxon nonparametric test for two independent samples (Gibbons, 1976).

5

For histopathological analyses, animals were anesthetized with metophane at various times after treatment and were exsanguinated by perfusion with heparinized saline. 500 IU of heparin were i.v. injected, the animal anesthetized with metofane and the systemic circulation perfused with PBS at a flow rate of 0.6 mls/min until the liver had been cleared of blood. The tumor and normal tissues were excised and formalin fixed (4% v/v). Paraffin sections of the tissues were cut and stained with the standard Martius Scarlet Blue (MSB) trichrome technique for detection of fibrin, and with hematoxylin and eosin stain for cell morphology.

15

B. Results

20

1. Improved Tumor Model

To improve the C1300 (Muy) tumor model as described before (Burrows et al., 1992), the inventors subcloned the C1300 (Muy) cell line into a cell line that can grow without being mixed with its parental cell, C1300, but still express the I-A^d MHC Class II antigen on the endothelial cells of the tumor. The inventors used an anti-I-A^d antibody (B21-2) that has a 5-10 fold higher affinity for its antigen than the initial anti-I-A^d antibody (M5/114.15.2) used in this model as determined by FACS. In vivo distribution studies with this new anti-I-A^d antibody showed the same tissue distribution pattern as did M5/114.15.2. Intense staining with B21-2 was seen in tumor vascular endothelium, light to moderate staining in Kupffer cells in the liver, the marginal

30

35

- 170 -

zones in the spleen and some areas in the small and large intestines. Vessels in other normal tissues were unstained.

5 2. Determination of Suitable In Vivo Doses

 The maximum tolerated dose was 16 μ g B21-2/10H10 plus 11 μ g tTF injected intravenously into the tail vein of mice. At this dose, mice lost no weight and had
10 normal appearance and activity levels. At a higher dose of 20 μ g B21-2/10H10 plus 16 μ g tTF, two of ten mice developed localized dermal hemorrhages which eventually resolved. The lower dose was adopted for in vivo studies. Truncated TF itself was not toxic at 50 μ g,
15 given intravenously.

 3. Specific Coagulation and Infarction in Tumor Vasculature

20 Intravenous administration of a coaguligand composed of B21-2/10H10 (20 μ g) and tTF (16 μ g) to mice bearing solid C1300 (Muy) tumors caused tumors to assume a blackened, bruised appearance within 30 minutes. A histological study of the time course of events within
25 the tumor revealed that 30 minutes after injection of coaguligand all vessels in all regions of the tumor were thrombosed (FIG. 3B). Vessels contained platelet aggregates, packed red cells and fibrin. At this time, tumor-cells were healthy, being indistinguishable
30 morphologically from tumor cells in untreated mice (FIG. 3A).

 By 4 hours, signs of tumor cell distress were evident. The majority of tumor cells had begun to
35 separate from one another and had developed pyknotic nuclei (FIG. 3C). Erythrocytes were commonly observed in

- 171 -

the tumor interstitium. By 24 hours, advanced tumor necrosis was visible throughout the tumor (FIG. 3D). By 72 hours, the entire central region of the tumor had compacted into morphologically indistinct debris.

5

In one of three of the tumors examined, a viable rim of tumor cells 5-10 cell layers thick was visible on the outskirts of the tumor where it was infiltrating into surrounding normal tissues. Immunohistochemical examination of serial sections of the same tumor revealed that the vessels in the regions of tumor infiltration lacked class II antigens.

Tumors from control mice which had received B21-2/10H10 bispecific antibody (20 μ g) alone 30 minutes or 24 hours earlier showed no signs of infarction. Tumors from mice which received tTF (16 μ g), alone or in combination with B21-2/OX7 or SFR8/10H10, showed no signs of infarction 30 min after injection but 24 hours after injection, occasional vessels (about 20% of vessels overall) in the tumor were infarcted. These appeared to be most prevalent in the core of the tumor.

No thrombi or morphological abnormalities were visible in paraffin sections of liver, kidney, lung, intestine, heart, brain, adrenals, pancreas and spleen taken from tumor-bearing mice 30 minutes, 4 hours and 24 hours after administration of coaguligand or tTF.

30 4. Tumor Regressions of Solid Tumors

FIG. 4 shows the results of a representative anti-tumor study in which a coaguligand composed of B21-2/10H10 and tTF was administered to mice with 0.8 cm diameter tumors. The tumors regressed to approximately half their pretreatment size. Repeating the treatment on

- 172 -

the 7th day caused the tumors to regress further, usually completely. In 5/7 animals, complete regressions were obtained. Two of the mice subsequently relapsed four and six months later. These anti-tumor effects are statistically highly significant ($P < 0.001$) when compared with all other groups.

Tumors in mice treated with tTF alone or with tTF mixed with the isotype-matched control bispecific antibodies, SFR8/10H10 or B21-2/OX7, grew more slowly than those in groups receiving antibodies or diluent alone. These differences were statistically significant ($P < 0.05$) on days 12-14. Thus, part of the anti-tumor effects seen with the B21-2/10H10 coaguligand are attributable to a slight non-specific action of tTF itself.

At the end of the study, two mice which had been treated with diluent alone and which had very large tumors of 2.0 cm^3 and 2.7 cm^3 (i.e. 10-15% of their body weight) were given coaguligand therapy. Both had complete remissions although their tumors later regrew at the original site of tumor growth.

25 C. Discussion

The present studies show that soluble human tTF, possessing practically no ability to induce coagulation, became a powerful thrombogen for tumor vasculature when targeted by means of a bispecific antibody to tumor endothelial cells. *In vitro* coagulation studies showed that the restoration of thrombotic activity of tTF is mediated through its cross-linking to antigens on the cell surface.

35

- 173 -

tTF binds factors VII and VIIa with high affinity and enhances the catalytic activity of VIIa but does not induce coagulation of plasma because the tTF:VIIa complex has to be associated with a membrane surface for efficient activation of factors IX and X (Ruf et al., 1991; Krishnaswamy et al., 1992). Tethering of tTF:VIIa to the cell surface by means of a bispecific antibody restores its ability to induce coagulation by bringing the tTF:VIIa into close proximity to the membrane: the membrane phospholipid provides the surface on which the coagulation-initiation complexes with factors IX or X can assemble and efficiently produce intermediates in the clotting process.

Administration of a coaguligand directed against class II to mice having tumors with class II-expressing vasculature caused rapid thrombosis of blood vessels throughout the tumor. This was followed by infarction of the tumor and complete tumor regressions in a majority of animals. In those animals where complete regressions were not obtained, the tumors grew back from a surviving rim of tumor cells on the periphery of the tumor where it had infiltrated into the surrounding normal tissues. The vessels at the growing edge of the tumor lacked class II antigens, thus explaining the lack of thrombosis of these vessels by the coaguligand. It is likely that these surviving cells would have been killed by coadministering a drug acting on the tumor cells themselves, as was found previously (Burrows & Thorpe, 1993).

The anti-tumor effects of the coaguligand were similar in magnitude to those obtained in the same tumor model with an immunotoxin composed of anti-class II antibody and deglycosylated ricin A-chain (Burrows & Thorpe, 1993). One difference between the two agents is their rapidity of action. The coaguligand induced

- 174 -

thrombosis of tumor vessels in less than 30 minutes
whereas the immunotoxin took 6 hours to achieve the same
effect. The immunotoxin acts more slowly because
thrombosis is secondary to endothelial cell damage caused
5 by the shutting down of protein syntheses.

A second and important difference between the
immunotoxin and the coaguligand is that they have
different toxic side effects. The immunotoxin caused a
10 lethal destruction of class II-expressing
gastrointestinal epithelium unless antibiotics were given
to suppress class II induction by intestinal bacteria.
The coaguligand caused no gastrointestinal damage, as
expected because of the absence of clotting factors
15 outside of the blood, but caused coagulopathies in
occasional mice when administered at high dosage.

The findings described in this report demonstrate
the therapeutic potential of targeting human coagulation-
20 inducing proteins to tumor vasculature. For clinical
application, antibodies or other ligands are needed that
bind to molecules that are present on the surface of
vascular endothelial cells in solid tumors but absent
from endothelial cells in normal tissues. Tumor
25 endothelial markers could be induced directly by tumor-
derived angiogenesis factors (Folkman, 1985) or cytokines
(Burrows et al., 1991; Ruco et al., 1990), or could
relate to the rapid proliferation (Denekamp & Hobson,
1982) and migration (Folkman, 1985) of endothelial cells
30 during neovascularization.

Several candidate antibodies have been described.
The antibody TEC-11, against endoglin is a particular
example that binds selectively to human tumor endothelial
35 cells.

- 175 -

Other antibodies include FB5, against endosialin (Rettig et al., 1992), E-9, against an endoglin-like molecule (Wang et al., 1993), BC-1, against a fibronectin isoform (Carnemolla et al., 1989) and TP-1 and TP-3, against an osteosarcoma-related antigen (Bruland et al., 1988). CD34 has been reported to be upregulated on migrating endothelial cells and on the abluminal processes of budding capillaries in tumors and fetal tissues (Schlingemann et al., 1990). The receptors for vascular endothelial cell growth factor (VEGF) become upregulated in tumor blood vessels (Plate et al., 1993; Brown et al., 1993) probably in response to hypoxia (Thieme et al., 1995), and selectively concentrate VEGF in tumor vessels (Dvorak et al., 1991).

15

The induction of tumor infarction by targeting coagulation-inducing proteins to these and other tumor endothelial cell markers is proposed as a valuable new approach to the treatment of solid tumors. The coupling of human (or humanized) antibodies to human coagulation proteins to produce wholly human coaguligands is particularly contemplated, thus permitting repeated courses of treatment to be given to combat both the primary tumor and its metastases.

25

EXAMPLE IV

SYNTHESIS OF TRUNCATED TISSUE FACTOR (tTF) CONSTRUCTS

tTF is herein designated as the extracellular domain of the mature tissue factor protein (amino acid 1-219 of the mature protein; SEQ ID NO:23). SEQ ID NO:23 is encoded by, e.g., SEQ ID NO:22.

- 176 -

A. H₆[tTF]

H₆ Ala Met Ala[tTF]. The tTF complimentary DNA (cDNA) was prepared as follows: RNA from J-82 cells (human bladder carcinoma) was used for the cloning of tTF. Total RNA was isolated using the GlassMaxTM RNA microisolation reagent (Gibco BRL). The RNA was reverse transcribed to cDNA using the GeneAmp RNA PCR kit (Perkin Elmer). tTF cDNA was amplified using the same kit with the following two primers:

5' primer: 5' GTC ATG CCA TGG CCT CAG GCA CTA CAA
(SEQ ID NO:1)

3' Primer: 5' TGA CAA GCT TAT TCT CTG AAT TCC CCC TTT CT
(SEQ ID NO:2)

The underlined sequences codes for the N-terminus of tTF. The rest of the sequence in the 5' primer is the restriction site for NcoI allowing the cloning of tTF into the expression vector. The sequence in the 3' primer is the HindIII site for cloning tTF into the expression vector. PCR amplification was performed as suggested by the manufacturer. Briefly, 75 μ M dNTP; 0.6 μ M primer, 1.5 mM MgCl₂ were used and 30 cycles of 30" at 95°C, 30" at 55°C and 30" at 72°C were performed.

The *E. coli* expression vector H₆ pQE-60 was used for expressing tTF (Lee et al., 1994). The PCR amplified tTF cDNA was inserted between the NcoI and Hind3 site. H₆ pQE-60 has a built-in (His)₆ encoding sequence such that the expressed protein has the sequence of (His)₆ at the N terminus, which can be purified on a Ni-NTA column.

To purify tTF, tTF containing H₆ pQE-60 DNA was transformed to *E. coli* TG-1 cells. The cells were grown

- 177 -

to $OD_{600} = 0.5$ and IPTG was added to $30 \mu M$ to induce the tTF production. The cells were harvested after shaking for 18 h at $30^{\circ}C$. The cell pellet was denatured in 6 M Gu-HCl and the lysate was loaded onto a Ni-NTA column (Qiagen). The bound tTF was washed with 6 M urea and tTF was refolded with a gradient of 6 M - 1 M urea at room temperature for 16 h. The column was washed with wash buffer ($0.05 Na H_2 PO_4$, 0.3 M NaCl, 10% glycerol) and tTF was eluted with 0.2 M Imidazole in wash buffer. The eluted tTF was concentrated and loaded onto a G-75 column. tTF monomers were collected.

B. tTF

Gly[tTF]. The GlytTF complimentary DNA (cDNA) was prepared the same way as described in the previous section except the 5' primer was replaced by the following primer in the PCR.

5' primer: 5' GTC ATG CCA TGG CCC TGG TGC CTC GTG CTT CTG
GCA CTA CAA ATA CT (SEQ ID NO:3)

The underlined sequence codes for the N-terminus of tTF. The remaining sequence encodes a restriction site for NcoI and a cleavage site for thrombin.

The H_6 pQE60 expression vector and the procedure for protein purification is identical to that described above except that the final protein product was treated with thrombin to remove the H_6 peptide. This was done by adding 1 part of thrombin (Sigma) to 500 parts of tTF (w/w), and the cleavage was carried out at room temperature for 18 h. Thrombin was removed from tTF by passage of the mixture through a Benzamidine Sepharose 6B thrombin affinity column (Pharmacia).

- 178 -

C. Cysteine-modified tTFS

tTF constructs were modified with an N or C-terminal cysteine to allow for easier conjugation to derivatized antibody through a disulfide bond.

H₆ C[tTF]. (His)₆ Ala Met Ala Cys-[tTF]. The DNA was made as described in the previous section except that the 5' primer was replaced by the following primer in the PCR.

5' primer: 5' GTC ATG CCA TGG CCT GCT CAG GCA CTA CAA ATA
CTG TG (SEQ ID NO:4)

All of the procedures were the same as described above, except the N-terminal cys was protected with an exchangeable oxidizing/reducing reagent.

C[tTF]. Gly Ser Cys [tTF2-219]. The DNA was made as described in the previous section except that the 5' primer was replaced by the following primer in the PCR.

5' primer: 5' GTC ATG CCA TGG CCC TGG TGC CTC GTG GTT CTT
GCG GCA CTA CAA ATA CT (SEQ ID NO:5)

The vector construct and protein purification is the same as described for the (His)₆ Ala Met Ala Cys [tTF] construct, except that thrombin treatment was used to remove the (His)₆ as described above.

- 179 -

H₆ [tTF]C. (His)₆ Ala Met Ala [tTF] Cys. The DNA was made the same way as described in the (His)₆ AMA [tTF] sections, except that the 3' primer was replaced by the following primer.

5

3'primer:5'TGA CAA GCT TAG CAT TCT CTG AAT TCC CCC TTT CT
(SEQ ID NO:6)

10 The underlined sequence encodes the C-terminus of tTF. The rest of the sequence contains the HindIII restriction site for cloning tTF in to the expression vector.

15 All of the procedures are the same as described in the tTF section except that 10 mM β-ME was used in the 6 M Gu-HCl denaturing solution and the C-terminal cysteine was protected with an exchangeable oxidizing/reducing reagent.

20 Other [tTF] Cys monomers, such as [tTF 1-220] Cys, [tTF 1-221] Cys and [tTF 1-222] Cys are also made (and conjugated) using the same methodology.

D. C Linker [tTF]

25

The C Linker [tTF], Gly-Ser-Cys-(Gly)₄-Ser-(Gly)₄-Ser-(Gly)₄-Ser-[tTF], was also constructed. The cDNA was made using a two step PCR procedure as follows:

30 PCR 1: amplification of linker DNA

cDNA encoding the NcoI site, the thrombin cleavage site, cysteine, linker and the N-terminus of tTF was amplified using the following primers:

35

- 180 -

5' primer: 5' GTC ATG CCA TGG CCC TGG TGC CTC GTG GTT GCG
GA GGC GGT GGA TCA GGC (SEQ ID NO:7)

5 3' primer: 5' AGT ATT TGT AGT GCC TGA GGA TCC GCC ACC TCC
ACT (SEQ ID NO:8)

The underlined sequences encode the linker peptide.
The DNA template used in the PCR was double strand DNA
encoding the following linker.

10

Sequence: GGA GGC GGT GGA TCA GGC GGT GGA GGT AGT GGA GGT
GGC GGA TCC (SEQ ID NO:9)

15 The same PCR conditions were used as described in
the tTF section. The 95 b.p. amplified product was
linked to tTF DNA in the PCR2.

20 PCR 2: Linking the Cys-linker DNA to tTF DNA. DNA
templates used in the PCR were two overlapping DNA: The
95 b.p. DNA from PCR 1 as described above and tTF DNA.
The primers used were the following:

5' primer: 5' GTC ATG CCA TGG CCC TG (SEQ ID NO:10)

25 3' primer: 5' TGA CAA GCT TAT TCT CTG AAT TCC CCC TTT CT
(SEQ ID NO:11)

30 The final PCR product of 740 b.p. was digested with
NcoI and HindIII and inserted into the H₆ pQE 60 as
described in the tTF section.

The vector constructs and protein purification
procedures are all the same as described in the C[tTF]
section.

35

- 181 -

EXAMPLE V

SYNTHESIS OF DIMERIC TISSUE FACTOR

The inventors' reasoned that tissue factor dimers
5 may be more potent than monomers at initiating
coagulation. It is possible that native tissue factor on
the surface of J82 bladder carcinoma cells may exist as a
dimer (Fair et al., 1987). The binding of one factor VII
or VIIa molecule to one tissue factor molecule may also
10 facilitate the binding of another factor VII or VIIa to
another tissue factor (Fair et al., 1987; Bach et al.,
1986). Furthermore, tissue factor shows structural
homology to members of the cytokine receptor family
(Edgington et al., 1991) some of which dimerize to form
15 active receptors (Davies and Wlodawer, 1995). The
inventors therefore synthesized TF dimers, as follows.

A. [tTF] Linker [tTF].

20 The Gly [tTF] Linker [tTF] with the structure
Gly[tTF] (Gly)₄ Ser (Gly)₄ Ser (Gly)₄ Ser [tTF] was made.
Two pieces of DNA were PCR amplified separately and were
ligated and inserted into the vector as follows:

25 PCR 1: Preparation of tTF and the 5' half of the
linker DNA. The primer sequences in the PCR are as
follows:

5' primer: 5' GTC ATG CCA TGG CCC TGG TGC CTC GTG GTT CTT
30 GCG GCA CTA CAA ATA CT (SEQ ID NO:12)

3' primer: 5' CGC GGA TCC ACC GCC ACC AGA TCC ACC GCC TCC
TTC TCT GAA TTC CCC TTT CT (SEQ ID NO:13)

35 Gly[tTF] DNA was used as the DNA template. Further
PCR conditions were as described in the tTF section.

- 182 -

PCR 2: Preparation of the 3' half of the linker DNA and tTF DNA. The primer sequences in the PCR were as follows:

5 5' primer: 5' CGC GGA TCC GGC GGT GGA GGC TCT TCA GGC ACT
ACA AAT ACT GT (SEQ ID NO:14)

3' primer: 5' TGA CAA GCT TAT TCT CTG AAT TCC CCT TTC T
(SEQ ID NO:15)

10

tTF DNA was used as the template in the PCR. The product from PCR 1 was digested with NcoI and BamH. The product from PCR 2 was digested with HindIII and BamH. The digested PCR1 and PCR2 DNA were ligated with NcoI and
15 HindIII-digested H₆ pQE 60 DNA.

For the vector constructs and protein purification, the procedures were the same as described in the Gly [tTF] section.

20

B. Cys [tTF] Linker [tTF]

The Cys [tTF] Linker [tTF] with the structure Ser Gly Cys [tTF 2-219] (Gly)₄ Ser (Gly)₄ Ser(Gly)₄ Ser [tTF]
25 was also constructed. DNA was made by PCR using the following primers were used:

5' primer: 5' GTC ATG CCA TGG CCC TGG TGC CTC GTG GTT CTT
GCG GCA CTA CAA ATA CT (SEQ ID NO:16)

30

3' primer: 5' TGA CAA GCT TAT TCT CTG AAT TCC CCT TTC T
(SEQ ID NO:17)

[tTF] linker [tTF] DNA was used as the template.
35 The remaining PCR conditions were the same as described in the tTF section. The vector constructs and protein

- 183 -

purification were all as described in the purification of $H_6C[tTF]$.

C. [tTF] Linker [tTF]cys

5

The [tTF] Linker [tTF]cys dimer with the protein structure [tTF] (Gly)₄ Ser (Gly)₄ Ser (Gly)₄ Ser [tTF] Cys was also made. The DNA was made by PCR using the following primers:

10

5' primer: 5' GTC ATG CCA TGG CCC TGG TGC CTC GTG GTT GCA
CTA CAA ATA CT (SEQ ID NO:18)

15

3'primer:5' TGA CAA GCT TAG CAT TCT CTG AAT TCC CCT TTC T
(SEQ ID NO:19).

20

[tTF] linker [tTF] DNA was used as the template. The remaining PCR conditions were the same as described in the tTF section. The vector constructs and protein purification were again performed as described in the purification of [tTF]cys section.

D. Chemically Conjugated Dimers

25

[tTF] Cys monomer are conjugated chemically to form [tTF] Cys-Cys [tTF] dimers. This is done by adding an equal molar amount of DTT to the protected [tTF] Cys at room temperature for 1 hr to deprotect and expose the cysteine at the C-terminus of [tTF] Cys. An equal molar amount of protected [tTF] Cys is added to the DTT/[tTF] Cys mixture and the incubation is continued for 18 h at room temperature. The dimers are purified on a G-75 gel filtration column.

30

35

The Cys [tTF] monomer is conjugated chemically to form dimers using the same method.

- 184 -

EXAMPLE VI

SYNTHESIS OF TISSUE FACTOR MUTANTS

Two tTF mutants are described that lack the capacity
5 to convert tTF-bound factor VII to factor VIIa. There is
300-fold less factor VIIa in the plasma compared with
factor VII (Morrissey et al., 1993). Therefore,
circulating mutant tTF should be less able to initiate
coagulation and hence exhibit very low toxicity. In
10 coaguligands, once the mutant tTF has localized through
the attached antibody to the tumor site, Factor VIIa will
be injected to exchange with the tTF-bound Factor VII.
The mutants are active in the presence of factor VIIa.

15 A. [tTF]G164A

The "[tTF]G164A" has the mutant protein structure
with the amino acid 164 (Gly) of tTF being replaced by
Ala. The Chameleon double-stranded site directed
20 mutagenesis kit (Stratagene) is used for generating the
mutant. The DNA template is Gly[tTF] DNA and the
sequence of the mutagenizing primer is:

5' CAA GTT CAG CCA AGA AAAC (SEQ ID NO:20)

25

The vector constructs and protein purification
procedures described above are used in the purification
of Gly[tTF].

30 B. [tTF] W158R S162A

The [tTF]W158R S162A is a double mutant in which
amino acid 158 (Trp) of tTF is replaced by Arg and amino
acid 162 (Ser) is replaced by Ala. The same mutagenizing

- 185 -

method is used as described for [tTF] G164A. The mutagenizing primer is:

5' ACA CTT TAT TAT CGG AAA TCT TCA GCT TCA GGA AAG
(SEQ ID NO:21)

The foregoing vector constructs and protein purification procedures are used for purifying Gly[tTF].

10

EXAMPLE VII

SYNTHESIS OF TISSUE FACTOR CONJUGATES

A. Chemical Derivatization and Antibody Conjugation

15 Antibody tTF conjugates were synthesized by the linkage of chemically derivatized antibody to chemically derivatized tTF via a disulfide bond (as exemplified in FIG. 5).

20 Antibody was reacted with a 5-fold molar excess of succinimidyl oxycarbonyl- α -methyl α -(2-pyridyldithio)toluene (SMPT) for 1 hour at room temperature to yield a derivatized antibody with an average of 2 pyridyldisulphide groups per antibody
25 molecule. Derivatized antibody was purified by gel permeation chromatography.

A 2.5-fold molar excess of tTF over antibody was reacted with a 45-fold molar excess of 2-iminothiolane
30 (2IT) for 1 hour at room temperature to yield tTF with an average of 1.5 sulfhydryl groups per tTF molecule. Derivatized tTF was also purified by gel permeation chromatography and immediately mixed with the derivatized antibody.

35

- 186 -

The mixture was left to react for 72 hours at room temperature and then applied to a Sephacryl S-300 column to separate the antibody-tTF conjugate from free tTF and released pyridine-2-thione. The conjugate was separated from free antibody by affinity chromatography on a anti-tTF column. The predominant molecular species of the final conjugate product was the singly substituted antibody-tTF conjugate (Mr approx. 176,000) with lesser amounts of multiply substituted conjugates (Mr \geq approx. 202,000) as assessed by SDS-PAGE.

B. Conjugation of Cysteine-Modified tTF to Derivatized Antibody

Antibody-C[TF] and [tTF]C conjugates were synthesized by direct coupling of cysteine-modified tTF to chemically derivatized antibody via a disulfide bond (as exemplified in FIG. 5).

Antibody was reacted with a 12-fold molar excess of 2IT for 1 hour at room temperature to yield derivatized antibody with an average of 1.5 sulfhydryl groups per antibody molecule. Derivatized antibody was purified by gel permeation chromatography and immediately mixed with a 2-fold molar excess of cysteine-modified tTF. The mixture was left to react for 24 hours at room temperature and then the conjugate was purified by gel permeation and affinity chromatography as described above.

The predominant molecular species of the final conjugate was the singly substituted conjugate (Mr approx. 176,000) with lesser amounts of multiple substituted conjugates (Mr \geq approx. 202,000) as assessed by SDS-PAGE.

- 187 -

C. Conjugation of Cysteine-Modified tTF to Fab' Fragments

Antibody Fab'-C[tTF] and [tTF]C conjugates are prepared. Such conjugates may be more potent *in vivo* because they should remain on the cell surface for longer than bivalent conjugates due to their limited internalization capacity. Fab' fragments are mixed with a 2-fold molar excess of cysteine-modified tTF for 24 hours and then the conjugate purified by gel permeation and affinity chromatography as described above.

D. Clotting Activity of tTF Conjugates

tTF conjugates were prepared with the B21-2 monoclonal antibody which binds to Class II antigens expressed on the surface to A20 cells. The conjugates were prepared with chemically derivatized tTF and cysteine-modified tTF and the ability of the conjugates to clot mouse plasma in CaCl_2 was determined after their binding to the surface of A20 cells.

Both B21-2 conjugates shortened the clotting time of mouse plasma in CaCl_2 (control) in a dose-dependent manner. The tTF conjugates displayed a similar enhancement in coagulation as occurred when tTF was tethered to the surface of A20 cells with the bispecific antibody B21-2/10H10 (FIG. 6).

E. Anti-tumor Cell tTF Conjugates

It has already been established that when tTF is targeted to tumor vascular endothelial cells it induces coagulation within the tumor vessels (Examples I through III). The inventors' contemplated that coagulation would

- 188 -

be induced in tumor vessels if tTF was targeted to the surface of tumor cells.

Three anti-tumor cell antibodies, KS1/4, D612, and
5 XMMCO-791, were conjugated to tTF as described in the
"Preparation of tTF conjugates" section above. KS1/4 was
obtained from Dr. R. Reisfeld at the Scripps Research
Institute, Department of Immunology, La Jolla,
California, and is also described in U.S. Patent
10 4,975,369; D612 was obtained from Dr. J. Schlom at the
NCI, Laboratory of Tumor Immunology and Biology,
Bethesda, Maryland, is described in U.S. Patent 5,183,756
and can be obtained from culture supernatants from the
ATCC hybridoma cell line Accession No. HB 9796; XMMCO-791
15 was purified from tissue culture supernatant from the
hybridoma cell line purchased from the ATCC.

The human colon carcinoma cell line Widr was used as
a target cell for KS1/4. Widr cells were purchased from
20 the ATCC and were maintained in DMEM supplemented with
10% (v/v) fetal calf serum, L-glutamine and antibiotics
in an atmosphere of 10% (v/v) CO₂ in air. The human
colon carcinoma cell line LS147T was used as a target
cell for D612. LS147T cells were purchased from the ATCC
25 and were maintained in RPMI supplemented with 10% (v/v)
fetal calf serum, L-glutamine and antibiotics in an
atmosphere of 5% (v/v) CO₂ in air. The human non small
cell lung cancer cell line H460 was used as a target cell
for XMMCO-791. H460 cells were obtained from Dr. Adi
30 Gazdar, Simmons Cancer Center, University of Texas
Southwestern Medical Center, Dallas, Texas and were
maintained in DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal calf
serum, L-glutamine and antibiotics in an atmosphere of
10% (v/v) CO₂ in air. All three cell lines grew as
35 adherent monolayers.

- 189 -

The conjugates were tested for their ability to enhance the clotting time of mouse plasma in CaCl_2 when bound to tumor cells expressing the relevant target antigens. Tumor cells were removed from tissue culture flasks with 0.05% (w/v) EDTA in PBS. The cells were preincubated with TF9-6B4 and TF8-5G9 antibodies to neutralize any native tissue factor activity (Morrissey et. al., 1988) and then the coagulation assay was performed as described for A20 cells.

10

When bound to their target cell line, all three conjugates shortened the clotting time of mouse plasma in CaCl_2 (control) in a dose-dependent manner (FIG. 7), indicating that coagulation was accelerated at the surface of tumor cells when tTF was targeted to the cell surface.

15

EXAMPLE VIII

SYNTHESIS OF TISSUE FACTOR PRODRUGS

20

Exemplary tTF prodrugs have the following structures: $\text{tTF}_{1-219} (\text{X})_{n1} (\text{Y})_{n2} \text{Z Ligand}$, where tTF_{1-219} represents TF minus the cytosolic and transmembrane domains; X represents a hydrophobic transmembrane domain $n1$ amino acids (AA) in length (1-20 AA); Y represents a hydrophilic protease recognition sequence of $n2$ AA in length (sufficient AA to ensure appropriate protease recognition); Z represents a disulfide thioester or other linking group such as $(\text{Cys})_{1-2}$; Ligand represents an antibody or other targeting moiety recognizing tumor-cells, tumor EC, connective tissue (stroma) or basal lamina markers.

25

30

The tTF prodrug is contemplated for injection intravenously allowing it to localize to diseased tissue (i.e. tumor). Once localized in the diseased tissue,

35

- 190 -

endogenous proteases (i.e., metalloproteinases, thrombin, factor Xa, factor VIIa, factor IXa, plasmin) will cleave the hydrophilic protease recognition sequence from the prodrug which will allow the hydrophobic transmembrane sequence to insert into a local cell membrane. Once the tail has inserted into the membrane, the tTF will regain its coagulation-inducing properties resulting in clot formation in the vasculature of the diseased tissue.

10

EXAMPLE IX**SYNTHESIS OF COAGULATION FACTORS**
LACKING THE Gla MODIFICATION

The vitamin-K-dependent coagulation factors (Factor II/IIa, Factor VII/VIIa, Factor IX/IXa and Factor X/Xa) lacking the Gla (γ -carboxyglutamic acid) modification are contemplated to be useful for the formation of coaguligands. Coagulation factors lacking the Gla modification are poor coagulants because the unmodified factors associate inefficiently with lipid membranes: targeting the factor via a ligand to the vasculature of tumors or other sites should bring the factor back into proximity to the cell surface and enable coagulation to proceed in that site.

25

"Gla" is made post-translationally by modifying the existing Glu (Glutamic acid) residues. Vitamin-K-dependent coagulation factors (Factor II/IIa, Factor VII/VIIa, Factor IX/IXa and Factor X/Xa) lacking the Gla modification may be made by expressing the genes that encode them in a host, such as bacteria, that does not modify Glu to Gla. The DNA sequences encoding each of Factor II/IIa, Factor VII/VIIa, Factor IX/IXa and Factor X/Xa are included herein as SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:27, respectively. Procaryotic expression is therefore straightforward.

- 191 -

Such Gla-lacking factors may also be made by mutating any of the sequences described above (SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:27) to change the corresponding Glu residues to another amino acid before expressing the genes, this time in virtually any host cell. The codon to be changed is the GAG codon (GAA also encodes Glu and is to be avoided). Using Factor VII as an example, the Gla "domain" is located generally in the 216-325 region. The first Gla-encoding triplet occurs at 231 of SEQ ID NO:25, and the last extends through 318 of SEQ ID NO:25. The GAG codons may readily be changed using molecular biological techniques.

FIG. 8 shows that the Gla domains of each of the above vitamin-K-dependent coagulation factors lie in an analogous region. Therefore, mutation of the so-called "corresponding" Glu residues in any one of SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:27 will also be straightforward.

The following Table of codons is provided to enable ready mutation choices to be made in modifying a given Gla-encoding codon or sequence.

- 192 -

<u>Amino Acids</u>				<u>Codons</u>					
5	Alanine	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
	Cysteine	Cys	C	UGC	UGU				
	Aspartic acid	Asp	D	GAC	GAU				
	Glutamic acid	Glu	E	GAA	GAG				
	Phenylalanine	Phe	F	UUC	UUU				
10	Glycine	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
	Histidine	His	H	CAC	CAU				
	Isoleucine	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
	Lysine	Lys	K	AAA	AAG				
15	Leucine	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
	Methionine	Met	M	AUG					
	Asparagine	Asn	N	AAC	AAU				
	Proline	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
	Glutamine	Gln	Q	CAA	CAG				
20	Arginine	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
	Serine	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
	Threonine	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
	Valine	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
	Tryptophan	Trp	W	UGG					
25	Tyrosine	Tyr	Y	UAC	UAU				

Site-specific mutagenesis is the technique contemplated for use in the preparation of individual vitamin-K-dependent coagulation factors lacking the Gla modification, through specific mutagenesis of the underlying DNA and the introduction of one or more nucleotide sequence changes into the DNA.

Site-specific mutagenesis allows the production of mutants through the use of specific oligonucleotide sequences which encode the DNA sequence of the desired

- 193 -

mutation, as well as a sufficient number of adjacent nucleotides, to provide a primer sequence of sufficient size and sequence complexity to form a stable duplex on both sides of the deletion junction being traversed.

5 Typically, a primer of about 17 to 25 nucleotides in length is preferred, with about 5 to 10 residues on both sides of the junction of the sequence being altered.

In general, the technique of site-specific
10 mutagenesis is well known in the art, as exemplified by publications such as Adelman et al. (1983) and by the TF mutant studies described above. The technique typically employs a phage vector which exists in both a single stranded and double stranded form. Typical vectors
15 useful in site-directed mutagenesis include vectors such as the M13 phage (Messing et al., 1981). These phage are readily commercially available and their use is generally well known to those skilled in the art. Double stranded plasmids are also routinely employed in site directed
20 mutagenesis which eliminates the step of transferring the gene of interest from a plasmid to a phage.

In general, site-directed mutagenesis in accordance herewith is performed by first obtaining a single-
25 stranded vector or melting apart the two strands of a double stranded vector which includes within its sequence a DNA sequence which encodes the vitamin-K-dependent coagulation factor. An oligonucleotide primer bearing the desired mutated sequence is prepared, generally
30 synthetically, for example by the method of Crea et al. (1978). This primer is then annealed with the single-stranded vector, and subjected to DNA polymerizing enzymes such as *E. coli* polymerase I Klenow fragment, in order to complete the synthesis of the mutation-bearing
35 strand. Thus, a heteroduplex is formed wherein one strand encodes the original non-mutated sequence and the

- 194 -

second strand bears the desired mutation. This heteroduplex vector is then used to transform appropriate cells, such as *E. coli* cells, and clones are selected which include recombinant vectors bearing the mutated sequence arrangement.

EXAMPLE X

FURTHER ANTI-TUMOR VASCULATURE ANTIBODIES

This example describes the generation of antibodies directed against tumor-derived endothelial cell "binding factors" for use in distinguishing between tumor vasculature and the vasculature of normal tissues. Particularly described is the generation of antibodies directed against vascular permeability factor (VPF), also termed vascular endothelial cell growth factor (VEGF), and against bFGF (basic fibroblast growth factor).

For further details concerning FGF one may refer to Gomez-Pinilla and Cotman (1992); Nishikawa et al. (1992), that describe the localization of basic fibroblast growth factor; Xu et al. (1992), that relates to the expression and immunochemical analysis of FGF; Reilly et al. (1989), that concerns monoclonal antibodies; Dixon et al. (1989), that relates to FGF detection and characterization; Matsuzaki et al. (1989), that concerns monoclonal antibodies against heparin-binding growth factor; and Herblin and Gross (1992), that discuss the binding sites for bFGF on solid tumors associated with the vasculature.

In the present studies, rabbits were hyperimmunized with N-terminal peptides of human VEGF, mouse VEGF, guinea pig VEGF, human bFGF, mouse bFGF or guinea pig bFGF coupled to tuberculin (purified protein derivative, PPD) or thyroglobulin carriers. The peptides were 25 to 26 amino acids in length and were synthesized on a

- 195 -

peptide synthesizer with cysteine as the C-terminal residue. Antisera were affinity purified on columns of the peptides coupled to Sephrose matrices.

5 Antibodies to VEGF were identified by ELISA and by their staining patterns on frozen sections of guinea pig tumors and normal tissues. Polyclonal antibodies to guinea pig VEGF and human VEGF reacted with the majority of vascular endothelial cells on frozen sections of
10 guinea pig L10 tumors and a variety of human tumors (parotid, ovarian, mammary carcinomas) respectively. The anti-human VEGF antibody stained mesangial cells surrounding the endothelial cells in normal human kidney glomerulae and endothelial cells in the liver, but did
15 not stain blood vessels in normal human stomach, leg muscle and spleen. The anti-guinea pig VEGF antibody did not stain endothelial cells in any normal tissues, including kidney, brain, spleen, heart, seminal vesicle, lung, large intestine, thymus, prostate, liver, testicle
20 and skeletal muscle.

 Polyclonal antibodies to human FGF stained endothelial cells in parotid and ovarian carcinomas, but not those in mammary carcinomas. Anti-human FGF
25 antibodies stained glomerular endothelial cells in human kidney, but not endothelial cells in normal stomach, leg muscle and spleen.

 Monoclonal antibodies to guinea pig VEGF, human VEGF
30 and guinea pig bFGF were prepared by immunizing BALB/c mice with the N-terminal sequence peptides (with cysteine at the C-terminus of the peptide) coupled to PPD or to thyroglobulin. The synthetic peptides immunogens of

- 196 -

defined sequence are shown below and are represented by
SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31 AND SEQ ID NO:32,
respectively:

5	guinea pig VEGF	A P M A E G E Q K P R E V V K F M D V Y K R S Y C
	human VEGF	A P M A E G G G Q N H H E V V K F M D V Y Q R S Y C
	guinea pig bFGF	M A A G S I T T L P A L P E G G D G G A F A P G C

10 The peptides were conjugated to thyroglobulin or to
PPD by derivatizing the thyroglobulin with succinimidyl 4-
(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) and
reacting the derivative with the peptide. This yields a
conjugate having one or more peptide sequences linked via
a thioether bond to thyroglobulin.

15

Specifically, the generation of monoclonal
antibodies against the above sequences was achieved using
the following procedure: BALB/c mice were immunized by
serial injections with peptide-PPD or peptide-
20 thyroglobulin into several sites. Four or five days
after the last injection, the spleens were removed and
splenocytes were fused with P3xG3Ag8.653 myeloma cells
using polyethyleneglycol according to the procedures
published in Morrow, *et al.* (1991).

25

- 197 -

Individual hybridoma supernatants were screened as follows:

5 First screen: ELISA on peptide-thyroglobulin-coated plates.

Second screen: ELISA on cysteine linked via SMCC to thyroglobulin.

10 Third screen: Indirect immunoperoxidase staining of frozen sections of guinea pig line 10 tumor or human parotid carcinoma.

15 Fourth screen: Indirect immunoperoxidase staining of frozen sections of miscellaneous malignant and normal guinea pig and human tissues.

20 Antibodies were selected that bound to peptide-thyroglobulin but not to cysteine-thyroglobulin, and which bound to endothelial cells in malignant tumors more strongly than they did to endothelial cells in normal tissues (Table VIII).

- 198 -

TABLE VIII
Reactivity of Monoclonal Antibodies

MoAB	Immunogen ⁺	Class	Reactivity with Tumor Endothelium		Tumor Reactivity Pattern*
			g. pig	human	
GV14	gp VEGF	IgM	+	+	BV + some tumor cells
GV35	gp VEGF	IgM	±	±	Tumor cells, weak on BV
GV39	gp VEGF	IgM	+	+	BV and some tumor cells
GV59	gp VEGF	IgM	+	+	BV and some tumor cells
GV97	gp VEGF	IgM	+	+	BV, weak on tumor cells
HV55	hu VEGF	IgG	?	+	Basement membrane, some BV
GF67	gp FGF	IgM	+	+	BV and tumor cells
GF82	gp FGF	IgM	+	+	BV and tumor cells

* BV = blood vessels + gp = guinea pig hu = human

- 199 -

A. GV97 Staining of Human and Guinea Pig Tissue
Sections

5 The GV97 antibody against guinea pig VEGF N-terminus
bound to endothelial cells in miscellaneous human
malignant (Table IX) and normal (Table X) tissues.

10 Binding to endothelial cells in malignant tumors
tended to exceed that to endothelial cells in normal
tissues.

15 The staining of endothelial cells in guinea pig
tumor (line 10 hepatocellular carcinoma) and normal
tissues was similar in distribution and intensity to that
observed with human tissues (Table XI).

20 In the Tables, + indicates a positive, as opposed to
a negative, result. The numbers 2+, 3+ and 4+ refer to a
positive signal of increasing strength, as is routinely
understood in this field of study.

TABLE IX. Anti-GPVEGF on Human Tumors

Tumor	TISSUE	20 ug/ml	Purified GV97		1ug/ml Or 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV3 9	GV59 supt.
			10ug/ml	5ug/ml						
DIGESTIVE TRACT										
92-01-A073	esophagus carcinoma		2+	1+	+/-	-ve			4+	4+
M4	Parotid						4+			
87-07-A134	Parotid carcinoma		3+	2+	+/-	-ve			3+	4+
M5	Parotid						4+			
88-04-A010	parotid adenoca.		1-2+	1+	-ve	-ve				1-3+
90-11-B319	Adeno. Ca. of colon to liver						3-4+		3-4+	
94-02-B021C	Adenocarcinoma of colon						3-4+		3-4+	
93-10-A333	Adeno. Ca. of colon with normal	4+	2-4+	1-4+	-ve-1+		4+			3+

5

10

15

20

-201-

TABLE IX continued...

Tumor	TISSUE	20 ug/ml	Purified GV97		1ug/ml Or 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV3 9	GV59 supt.
			10ug/ml	5ug/ml						
93-02-B004	Villous and Adenomatous polyp of colon	4+	3-4+	2-4+	1-2+		3-4+		2- 3+	
93-02-A130	Leiomyosarcoma in colon		3+	2+	+/-1+	-ve	4+		4+	3-4+
93-02-B020	Gastric Ca.		4+	2+	2-3+	-ve- 1+			1- 2+	4+
93-04-A221	Pancreas Adenoca.		3-4+	2-3+	1-2+	-ve- 0.5+			4+	4+
94-04-A390	rectum adenoca.		4+	3+	1-2+	1+				3+
93-12-A160	tongue carcinomaadenoca.		1-2+	+/-	-ve	-ve			3+	3+
101-84a	Stomach signet ring Ca. (101-84b pair)		3+	2+	-ve-1+	-ve	most 1-2+ but a few 3-4+			3+
90-05-A172	Stomach Adenoca.		4+	3+	1-2+	-ve- 1+			-ve	3+

5

10

15

20

TABLE IX continued...

			Purified GV97							
Tumor	TISSUE	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml or 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV3 9	GV59 supt.
REPRODUCTIVE TRACT										
91-10-A115	Squam. cell Ca. of vulva	1-4+	1-3+	1-2+	1-2+		1-4+			1-3+
93-03-A343	Prostate Adenoca.		+/- - 3-4+	+/- to 2-3+	+/- to 1-2+	+/-			3- 4+	3-4+
MUSCLE										
IMMUNE SYSTEM										
URINARY SYSTEM										
93-10-B002	Renal cell Ca.						2+			3+
90-01-A225	Renal cell Ca.		4+	4+	3-4+ of most	1-3+ of some	3-4+		3+	3-4+
93-01-A257	Transit. cell Ca. of bladder	3-4+	2-3+	1-2+	+/-		2-3+			2-3+

5

10

15

TABLE IX continued...

			Purified GV97									
Tumor	TISSUE	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml or 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV3 9	GV59 supt.		
ENDOCRINE SYSTEM												
94-01-A246	Pheochromocytoma of adrenal	4+	4+	3-4+	3+		4+			3-4+		
93-11-A074	Adrenal Cort. Ca.	3-4+	3-4+	2-3+	1+		3-4+			4+		
RESPIRATORY SYSTEM												
93-08-N009	Lung Adenoca.						3-4+		3- 4+	3-4+		
92-10-A316	Sq. cell lung Ca.		4+	3-4+	1-2+	-ve- 0.5+			4+	4+		
03-05-A065	Lung adenoca.		4+	3-4+	-ve-1+	1+			3+	3+		
CENTRAL NERVOUS SYSTEM												
94-01-A299	malignant metastatic schwannoma to lymph node	4+	4+	4+	3-4+		4+			3-4+		
92-10-A139	Meningioma	4+	3-4+	2-3+	1-2+		4+			3-4+		

TABLE IX continued...

Tumor	TISSUE	20 ug/ml	Purified GV97		1ug/ml Or 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV3 9	GV59 supt.
			10ug/ml	5ug/ml						
91-12-A013	Meningioma	4+	2-3+	-ve-3+	+/-		4+			3+
93-03-A361	Atypical meningioma		4+	4+	3+	2+	4+			3+
INTEGUMENTARY SYSTEM										
94-04-V037	Skin Sq. cell Ca. w/normal		-ve to 4+	-ve to 3+	-ve to 1+	-ve			2- 3+	2-3+
89-02-225	leg sarcoma		4+	3-4+	1+	1+			4+	2+
MISC. TUMORS										

5

10

15

TABLE X. Anti-GPVEGF on Human Normal Tissues

			Purified GV97								
		20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml or 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV39	GV59 supt.	
DIGESTIVE SYSTEM											
91-01-A128 Bladder w/ cystitis			3+	2+	1+	-ve			2-3+	2-3+	
94-02-B020 uninvolved colon							2-3+		2-3+		
92-01-A292 N. Colon	4+		4+	4+	3-4+		4+			3-4+	
93-10-A116 N. Colon	Z-4+		1-4+	1-3+	-ve-2+	-ve	3-4+		2-3+	3-4+	
90-06-A116 N. colon							3+ of many		2+		
93-02-A350 N. esophagus			3-4+	3+	1+	+/-			4+	4+	
93-05-A503 N. ileum							4+			4+	

5

10

15

20

-206-

TABLE X continued...

Tumor	TISSUE	20 ug/ml	Purified GV97		1 ug/ml or 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV39	GV59 supt.
			10ug/ml	5ug/ml						
	94-03-A244 N. Liver		4+	1-3+	-ve-1+	-ve			4+	4+
	90-02-B132 N. Liver	1+ of a few	+/-	-ve	-ve	-ve	1-3+	2- 3+	2-3+	2-3+
	94-01-A181 N. Pancreas		1-4+	1-3+	1-3+ of a few	-ve				3-4+
	90-05-D008 N. Pancreas		2-4+	1-3+	+/-	-ve			2-3+	2-3+
	93-05-A174 N. Parotid		2+ of a few	1-2+ of a few	1+ of a few	-ve	-ve		3+ of a few	2-3+
	94-04-A391 N. Small bowel		1-3+	-ve-2+	-ve	-ve				3+
	88-06-107 N. Stomach	3+	2+	+/-	-ve		3-4+			3+
	101-84b N. Stomach (101-84a pair)		3-4+ in main and periphery	2-3+ in main and 3- 4+ in periphery	+/- in main and 2+ in periphery	-ve in main and 1+ in periphery	3+			3-4+

5

10

15

TABLE X continued....

Tumor	TISSUE	20 ug/ml	Purified GV97		1ug/ml or 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV39	GV59 supt.
			10ug/ml	5ug/ml						
	90-11-B337 N. Stomach		2-3 +	+/-1 +	-ve	-ve			3 +	3 +
REPRODUCTIVE TRACT										
	93-04-A041 N. Breast						4 +		3 +	
	94-02-A197 N. Breast w/fibrocystic change						4 +		3 +	
	93-02-A051 Breast w/fibrocystic change		-ve-1 +	-ve	-ve	-ve			+/-	+/-2 +
	93-02-A103 Breast w/fibrocyst. change	4 +	3 +	2 +	1 +					
	92-11-A006 N. ectocervix	2 + of most	1-2 + of most	0.5 +	-ve	-ve	1-2 + of some			3 + of most

5

10

15

- 208 -

TABLE X continued...

Tumor	TISSUE	20 ug/ml	Purified GV97		1ug/ml or 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV39	GV59 supt.
			10ug/ml	5ug/ml						
	91-03-A207 N. ectocervix		2.5+	1.5+	1+	.5+				2-3+
	92-02-A139 N. ovary w/corp. luteum	1+ in most but 2+ in one area	-ve in most but 1+ in one area	-ve	-ve		-ve in most but 3-4+ in one area			-ve in most bet 3-4 in one area
	93-06-A11B N. Prostate		1+ of a few	-ve	-ve	-ve				3+
	93-11-A317d Prostate chip		3-4+	2-3+	-ve-3+	-ve-1+			3-4+	3-4+
	93-02-A315 Seminal Vesicle		0.5-1+	0.5+	-ve	-ve			1+	1.2+
	92-04-A069 N. testis		1+	+/-	+/-	+/-			1-2+	
	91-04-A117 Ureter w/inflammation		1+	+/-	-ve	-ve			+/--1+	3-4+

5

10

15

TABLE X continued....

Tumor	TISSUE	20 ug/ml	Purified GV97		5ug/ml	1ug/ml or 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV39	GV59 supt.
			10ug/ml								
MUSCLE											
94-01-A065 N.	Heart		3-4+	2+	+/-	-ve				3-4+	4+
91-07-D007 N.	skeletal muscle	1-4+	1-3+	1-2+	-ve	-ve	1-3+				1-3+
95-03-A395 N.	Skeletal muscle		4+	3-4+	1-2+	0.5-1+				4+	4+
IMMUNE SYSTEM											
90-01-A077 N.	lymph node	2-3+	2+	1+ of some	-ve	-ve	2-3+				3-4+
90-08-A022 N.	lymph node		most 1+ but a few 4+	most 0,5+ but a few 2+	most -ve but a few 2+	most -ve but a few 0.5-1+				3+	3+
91-03-A057 N.	lymph node		2+	1+	+/-	-ve				3-4+	3-4+
91-09-B017E	uninvolved lymph node		3+	2+	+/-1+	-ve				2-3+	2-3+

5

10

15

TABLE X continued...

Tumor	TISSUE	20 ug/ml	Purified GV97		1ug/ml or 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV39	GV59 supt.
			10ug/ml	5ug/ml						
93-07-A236 N. Spicen			3-4+	3-4+	-ve-3+	-ve				2-4+
93-07-252 N. spicen			3+	1+	+/-	-ve			2-3+	
ENDOCRINE SYSTEM										
94-04-A252 N. adrenal w/ medulla and cortex		4+	4+	3-4+	1-2+		4+			3+
93-05-A086 N. Adrenal medulla			most -ve a few 1-2+	most -ve a few 1-2+	-ve	-ve			2-3+	3-4+
92-03-A157 Hyperplasic thyroid			1+	+/-	+/-	-ve			4+	4+
91-03-B019 N. Thyroid			-ve-3+	-ve-2+	-ve-1+	-ve			2-3+	2-3+
URINARY SYSTEM										

5

10

15

TABLE X continued...

Tumor	TISSUE	20 ug/ml	Purified GV97		10ug/ml or 2ug/ml	0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV39	GV59 supt.
			10ug/ml	5ug/ml						
	93-09-A048 N. Kidney						4+			2-3+
	91-11-A075 N. Kidney		4+	3+	2+	1+	4+ on glomeruli		4+ on glomeruli	4+ on glomeruli
	93-10-B001 N. Kidney		4+	3+	+/-	-ve	4+ on glomeruli		4+ on glomeruli	4+ on glomeruli
INTEGUMENTARY SYSTEM										
	92-08-A029 N. Breast skin		+/- to 4+	+/- to 3+	+/- to 1+	+/-			2+	2+
	89-02-257 Cartilage marches 2SS		4+	3-4+	2-3+	1-2+			1+	3-4+
RESPIRATORY SYSTEM										
	93-05-A203 N. Lung		-ve-2+	-ve-1+	+/-	-ve			2+	3+

5

10

15

TABLE X continued...

Tumor	TISSUE	Purified GV97				0.5 ug/ml	GV97 supt.	GV1 4	GV39	GV59 supt.
		20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml or 2ug/ml					
92-12-A263 N.	Bronchus		2-3+ w/ducts staining 3- 4+	1-2+ w/ ducts staining 2- 3+	-ve	-ve				2-3+

TABLE XI. Staining Pattern of 9F7 anti-VEGF by direct immunohistochemical staining on 6-8 week old GP tissues

		Purified GV97						
TISSUE	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml or 2ug/ml	0.5 ug/ml	9F7 supt.	3F9 supt.	5F9 supt.
DIGESTIVE SYSTEM								
LIVER		2+	1-2+	+/-	+/-		1-2+	1-2+
INTESTINE	4+	3+	2+	1+			4+m lymphoid, rest diff. than	4+m lymphoid, rest diff. than
PANCREAS	1+ of many and 3+ in islands of cells							
SMALL INTESTINE	4+ of many and 4+ in lymphoid	2-3+ of many and 4+ in lymphoid, rest diff. than fVIII	1-2+ of many and 4+ in lymphoid, rest diff. than fVIII	+/- of many and 4+ in lymphoid, rest diff. than fVIII			3+ of some and 4+ in lymphoid	3+ of some and 4+ in lymphoid

TABLE XI continued...

			Purified GV97									
TISSUE	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml or 2ug/ml	0.5 ug/ml	9F7 supt.	3F9 supt.	5F9 supt.				
STOMACH	3-4+	1-2+ on most occasional 3+	+/- on most occasional 2+	+/- on most occasional 1+			3-4+ (some fVIII-ve)	3-4+ (some fVIII-ve)				
REPRODUCTIVE SYSTEM												
TESTIS												
MUSCLE AND INTEGUMENTARY SYSTEM												
HEART	-ve	-ve	-ve	-ve			3-4+ (some fVIII-ve)	3-4+ (some fVIII-ve)				
MUSCLE												
SKIN	1-2+ in fatty layer and 3-4+ in cellular layer	1+ in fatty layer and 3-4+ in cellular layer	+/- in fatty layer and 3-4+ of a few in cellular layer	+/- in fatty layer and 1-2+ of a few in cellular layer			3+	3+				

	Purified GV97						
TISSUE	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml or 2ug/ml	0.5 ug/ml	9F7 supt.	5F9 supt.
IMMUNE SYSTEM							
SPLEEN	4+	3+	2+	-ve		4+	4+
THYMUS							
URINARY SYSTEM							
KIDNEY	glomeruli 4+	glomeruli 3-4+	glomeruli 2-3+	glomeruli 1-2+		glomeruli 3-4+	glomeruli 3-4+
ENDOCRINE SYSTEM							
ADRENAL							
RESPIRATORY SYSTEM							
LUNG							
NERVOUS SYSTEM							
CEREBELLUM	4+	2+	+/- of most and 1+ of a few	+/- of most and 1+ of a few		4+	4+

TABLE XI continued...

			Purified GV97							
TISSUE	20 ug/ml	10ug/ml	5ug/ml	1ug/ml or 2ug/ml	0.5 ug/ml	9F7 supt.	3F9 supt.	5F9 supt.		
TUMORS										
TUMOR	4+	4+	3-4+	2-3+(2)		4+				3+

- 217 -

B. Lack of Reactivity of GV97 With Soluble Human VEGF

To identify antibodies that are specific for VEGF, the VEGF receptor (Flk-1) or VEGF bound (or complexed) to the receptor, an ELISA screening protocol was developed. The procedure is as follows:

Initially, a 96 well ELISA plate (round bottom) was coated (outside wells left blank) with 100 μ l/well of FLK/seap at 10 μ g/ml in sensitizing buffer. After overnight incubation, the plate was washed twice with PBS overnight at 4°C. Next the FLK/Seap coated plate was blocked with 250 μ l/well of PBS + CAH (5%) solution for 1 h at 37°C. The blocking solution was removed and the plate was vigorously tapped on paper towels.

The blocked plates were then incubated with 100 μ l/well of VEGF-165 (VEGF 165 aa form produced in yeast obtained from Dr. Ramakrishnan, University of Minnesota) at 2 μ g/ml in binding plus 0.1 μ g/ml heparin for 4 h at room temperature or overnight at 4°C. The VEGF solution was collected and the plate washed 2 times with PBS-tween (0.10%). Next, 100 μ l/well of hybridoma fusion supernatant was added to the wells and incubated for 1 h at 32°C. Following this supernatant incubation, the plate was washed 3 times with PBS tween and then incubated with 100 μ l well of secondary antibody (KPL, Gt anti-mouse IgG at 1:1000 in PBS tween + CAH (5%) for 1 hour at 37°C.

Following secondary antibody incubation, the plates were washed 4 times with PBS tween, incubated with 100 μ l/well of substrate (Substrate Sigma OPD dissolved in citrate buffer + H₂O₂) for 20 minutes and read at 490 nm on a Cambridge Technology Microplate Reader (Model 7520).

- 218 -

Wells with an absorbance above appropriate control wells were selected as positives and further characterized.

5 It was found that GV97 did not bind to recombinant VEGF-coated ELISA plates, nor did recombinant human VEGF bind to GV97 coated ELISA plates. Soluble recombinant human VEGF did not block the binding of 5 $\mu\text{g/ml}$ GV97 to tumor endothelium in histological sections even when added at 50 $\mu\text{g/ml}$.

10

These data suggest that GV97 recognizes an epitope of VEGF that is concealed in recombinant human VEGF but which becomes accessible when VEGF binds to its receptor on endothelial cells.

15

C. GV97 Localization in Line 10-Bearing Guinea Pigs

20 In contrast with staining data obtained from histological sections, GV97 antibody localized selectively to tumor endothelial cells after injection into line 10 tumor-bearing guinea pigs (Table XII). Staining of endothelial cells in the tumor was moderately strong whereas staining of normal endothelium in miscellaneous organs was undetectable.

25

D. Anti-bFGF Selectively Bind to Tumor Endothelial Cells

30 GV97 and GF82, which had been raised against guinea pig bFGF N-terminus, bound strongly to endothelial cells in frozen reactions of guinea pig line 10 tumor and to endothelial cells in two types of human malignant tumors (Table XIII). By contrast, relatively weak staining of endothelial cells in miscellaneous guinea pig normal
35 tissues was observed.

- 219 -

TABLE XII. GV97 injected into tumor bearing GP

TISSUE	GV97 10 ug/ml	GV 97 20 ug/ml serum volume injected
5	DIGESTIVE SYSTEM	
	LIVER	2+
		-ve
	INTESTINE	3+
		possible 0.5-1+ of a few
	PANCREAS	+/- of many and 2+ in islands of cells
		possible 0.5-1+ of a few
	SMALL INTESTINE	2-3+ of many and 4+ in lymphoid, rest diff. than fVIII
		+/-
10	STOMACH	1-2+ on most occasional 3+
		possibly 0.5+ of a few
	REPRODUCTIVE SYSTEM	
	TESTIS	
		+/-
	MUSCLE AND INTEGUMENTARY SYSTEM	
	HEART	-ve
		-ve
15	MUSCLE	
		-ve
	SKIN	1+ in fatty layer and 3-4+ in cellular layer
	IMMUNE SYSTEM	
	SPLEEN	3+
		possibly a few 1+
	THYMUS	
20	URINARY SYSTEM	
	KIDNEY	glomeruli 3-4+
	ENDOCRINE SYSTEM	
	ADRENAL	4+
		-ve
	RESPIRATORY SYSTEM	
25	LUNG	2+
		-ve
	NERVOUS SYSTEM	

TABLE XII continued... - 220 -

TISSUE	GV97 10 ug/ml	GV 97 20 ug/ml serum volume injected
CEREBELLUM	2+	-ve
TUMORS		
TUMOR	4+	2-3+

5

- 221 -

TABLE XIII. Anti-GP FGF Antibody Staining on GP Tissues

	GP TISSUE	GF 67	GF 82
	DIGESTIVE SYSTEM		
5	LIVER	ND	ND
	INTESTINE	+/-	+/-
	PANCREAS	2-3+	2+
	SMALL INTESTINE	+/-	+/-
	STOMACH	ND	ND
10	REPRODUCTIVE SYSTEM		
	TESTIS	ND	ND
	MUSCLE AND INTEGUMENTARY SYSTEM		
	HEART	2-3+	1+
	MUSCLE	+/-	1+
15	SKIN	ND	ND
	IMMUNE SYSTEM		
	SPLEEN	3+	-ve
	THYMUS		
	URINARY SYSTEM		
20	KIDNEY	1-2+	-ve
	ENDOCRINE SYSTEM		
	ADRENAL	1-2+	+/-
	RESPIRATORY SYSTEM		
	LUNG	1-2+	2-3+
25	NERVOUS SYSTEM		
	CEREBELLUM	1+	-1+
	TUMORS		
	LINE 1 TUMOR	4+	4+
	HUMAN TUMORS		
30	PHEOCHROMO CYTOMA	4+	4+
	SCHWANOMA	4+	4+

EXAMPLE XI

This example is concerned with human treatment protocols using the bispecific binding and coagulating ligands of the invention. These ligands are contemplated for use in the clinical treatment of various human cancers and even other disorders, such as benign prostatic hyperplasia and rheumatoid arthritis, in which the intermediate or longer term arrest of blood flow would be advantageous.

The bispecific ligands are considered to be particularly useful tools in anti-tumor therapy. From the data presented herein, including the animal studies, and the knowledge in the art regarding treatment of Lymphoma (Glennie *et al.*, 1988), T-Cell targeting (Nolan & Kennedy, 1990) and drug targeting (Paulus, 1985) appropriate doses and treatment regimens may be straightforwardly developed.

Naturally, before wide-spread use, further animal studies and clinical trials will be conducted. The various elements of conducting a clinical trial, including patient treatment and monitoring, will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. The following information is being presented as a general guideline for use in establishing such trials.

It is contemplated that patients chosen for the study would have failed to respond to at least one course of conventional therapy and had to have objectively measurable disease as determined by physical examination, laboratory techniques, or radiographic procedures. Where
35 murine monoclonal antibody portions are employed, the

- 223 -

patients should have no history of allergy to mouse immunoglobulin. Any chemotherapy should be stopped at least 2 weeks before entry into the study.

5 In regard to bispecific ligand administration, it is considered that certain advantages will be found in the use of an indwelling central venous catheter with a triple lumen port. The bispecific ligands should be filtered, for example, using a 0.22 μ m filter, and diluted
10 appropriately, such as with saline, to a final volume of 100 ml. Before use, the test sample should also be filtered in a similar manner, and its concentration assessed before and after filtration by determining the A_{280} . The expected recovery should be within the range
15 of 87 to 99%, and adjustments for protein loss can then be accounted for.

 The bispecific ligands may be administered over a period of approximately 4-24 hours, with each patient
20 receiving 2-4 number of infusions at 2-7 day intervals. Administration can also be performed by a steady rate of infusion over a 7 day period. The infusion given at any dose level should be dependent upon any toxicity observed. Hence, if Grade II toxicity was reached after
25 any single infusion, or at a particular period of time for a steady rate infusion, further doses should be withheld or the steady rate infusion stopped unless toxicity improved. Increasing doses of bispecific coagulating ligands should be administered to groups of
30 patients until approximately 60% of patients showed unacceptable Grade III or IV toxicity in any category. Doses that are 2/3 of this value could be defined as the safe dose.

35 Physical examination, tumor measurements, and laboratory tests should, of course, be performed before

- 224 -

treatment and at intervals up to 1 month later. Laboratory tests should include complete blood counts, serum creatinine, creatine kinase, electrolytes, urea, nitrogen, SGOT, bilirubin, albumin, and total serum protein. Serum samples taken up to 60 days after treatment should be evaluated by radioimmunoassay for the presence of the intact bispecific ligand or components thereof and antibodies against any or both portions of the ligand. Immunological analyses of sera, using any standard assay such as, for example, an ELISA or RIA, will allow the pharmacokinetics and clearance of the therapeutic agent to be evaluated.

To evaluate the anti-tumor responses, it is contemplated that the patients should be examined at 48 hours to 1 week and again at 30 days after the last infusion. When palpable disease was present, two perpendicular diameters of all masses should be measured daily during treatment, within 1 week after completion of therapy, and at 30 days. To measure nonpalpable disease, serial CT scans could be performed at 1-cm intervals throughout the chest, abdomen, and pelvis at 48 hours to 1 week and again at 30 days. Tissue samples should also be evaluated histologically, and/or by flow cytometry, using biopsies from the disease sites or even blood or fluid samples if appropriate.

Clinical responses may be defined by acceptable measure. For example, a complete response may be defined by the disappearance of all measurable tumor 1 month after treatment. Whereas a partial response may be defined by a 50% or greater reduction of the sum of the products of perpendicular diameters of all evaluable tumor nodules 1 month after treatment, with no tumor sites showing enlargement. Similarly, a mixed response may be defined by a reduction of the product of

- 225 -

perpendicular diameters of all measurable lesions by 50% or greater 1 month after treatment, with progression in one or more sites.

5

* * *

All of the compositions and methods disclosed and claimed herein can be made and executed without undue experimentation in light of the present disclosure.

10 While the compositions and methods of this invention have been described in terms of preferred embodiments, it will be apparent to those of skill in the art that variations may be applied to the composition, methods and in the steps or in the sequence of steps of the method described
15 herein without departing from the concept, spirit and scope of the invention. More specifically, it will be apparent that certain agents which are both chemically and physiologically related may be substituted for the agents described herein while the same or similar results
20 would be achieved. All such similar substitutes and modifications apparent to those skilled in the art are deemed to be within the spirit, scope and concept of the invention as defined by the appended claims.

25

REFERENCES

The following references, to the extent that they provide exemplary procedural or other details
30 supplementary to those set forth herein, are specifically incorporated herein by reference.

Abbassi et al., *J Clin Invest*, 92(6):2719-30, 1993.

35 Abraham et al., *Science*, 233:545-548, 1986.

- 226 -

- Abrams & Oldham, Monoclonal antibody therapy of human cancer, Foon & Morgan (Eds.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 103-120, 1985.
- 5 Adams et al., *Cancer Res.*, 43:6297, 1983.
- Adelman et al., *DNA* 2:183, 1983.
- Alvarez et al., *Modern Pathology*, 5(3):303-307, 1992.
- 10 Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- Arklie et al., *Int. J. Cancer*, 28:23, 1981.
- 15 Ashall et al., *Lancet*, 2(8288):7-10, 1982.
- Atkinson et al., *Cancer Res.*, 62:6820, 1982.
- 20 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989.
- Bach et al., *Biochemistry*, 25, 4007-4020, 1986.
- 25 Bauer et al., *Vox Sang*, 61:156-157, 1991.
- Baxter et al., *Micro. Res.*, 41(1):5-23, 1991.
- 30 Bevilacqua et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:9238-9242, 1987.
- Bhagwa et al., *Nature*, 316:511-513, 1985.
- 35 Bhattacharya et al., *Hybridoma*, 4:153, 1985.

- 227 -

- Bhattacharya et al., *Cancer Res.*, 44:4528, 1984.
- Bicknell and Harris, *Seminars in Cancer Biology*, 3:399-407, 1992.
- 5 Bikfalvi et al., *Exp. Cell Res.*, 181:75-84, 1989.
- Birembaut et al., *J. Pathology*, 145:283-296, 1985.
- 10 Bittner et al., *Methods in Enzymol.*, 153:516-544, 1987.
- Bjorndahl et al., *Eur. J. Immunol.*, 19:881-887, 1989.
- 15 Blakey et al., *Biochem Biophys ACTA*, 923Y(1):59-65, 1987b.
- Blakey et al., *Cancer Res.*, 47:947-952, 1987a.
- Bolhuis et al., *J. Immunol.*, 149:1840-1846, 1992.
- 20 Borden et al., *Cancer*, 65:800-814, 1990.
- Brennan et al., *Science*, 229:81-83, 1985.
- 25 Brinkmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88(19):8616-20, 1991.
- Brooks et al., *Cell*, 79:1157-1164, 1994.
- 30 Brooks et al., *Science*, 264:569-571, 1994.
- Brown et al., *J. Exp. Med.*, 176:1375-1379, 1992.
- Brown et al., *PNAS*, 78:539, 1981a.
- 35 Brown et al., *J. Immunol.*, 127:539, 1981b.

- 228 -

- Brown et al., *Cancer Res.*, 53:4727-4735, 1993.
- Broze, *Seminars in Hematol.*, 29:159-169, 1992.
- 5 Bruland et al., *Cancer Research*, 48:5302-5309, 1988.
- Bruland et al., *Int. J. Cancer*, 38(1):27-31, 1986.
- Bühring et al., *Leukemia*, 5:841-847, 1991.
- 10 Burchell et al., *J. Immunol.*, 131(1):508-13, 1983.
- Burrows, & Thorpe, *PNAS*, 90:8996-9000, 1993.
- 15 Burrows et al., *Cancer Res*, 52:5954-5962, 1992.
- Burrows et al., *Cancer Res.*, 51:4768-4775, 1991.
- Burrows et al., *Clin. Cancer Res.*, 1995 (in press).
- 20 Burtin et al., *Cancer*, 31:719-726, 1983.
- Byers & Baldwin, *Immunol*, 65:329-335, 1988.
- 25 Byers et al., *Cancer Res.*, 49:6153-6160, 1989.
- Byers et al., 2nd Int. Conf. Mab Immunocon., *Cancer*, 41:1987.
- 30 Campbell, In: Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13, Burden & Von Knippenberg (Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 75-83, 1984
- 35 Carnemolla et al., *J. Cell Biol.*, 108:1139-1148, 1989.

- 229 -

- Carnemolla et al., *J. Biol. Chem.*, 267(34):24689-24692, 1992.
- Carrel et al., *Hybridoma*, 1:387, 1982.
- 5 Cavenagh et al., *Br J Haematol*, 85(2):285-91, 1993.
- Chapman et al., *Arthritis Rheum*, 37(12):1752-6, 1994.
- 10 Chee et al., *Cancer Res.*, 43:3142, 1982.
- Chen et al., *J. Immunol*, 145:8-12, 1990.
- Cherwinski et al., *J. Exp. Med.*, 166:1229-1244, 1989.
- 15 Cheung et al., *Proc. AACR*, 27:318, 1986.
- Clark et al., *Biochim. Biophys. ACTA*, 867:244-251, 1986.
- 20 Clark et al., *Cancer Res.*, 51:944-948, 1991.
- Clark et al., *Int. J. Cancer*, 2:15-17, 1988.
- Clauss et al., *J. Exp. Med.*, 172:1535-1545, 1990.
- 25 Cohn et al., *Arch. Surg.*, 122:1425, 1987.
- Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150:1, 1981.
- 30 Colcher et al., *Cancer Invest*, 1:127, 1983.
- Colcher et al., *Cancer Res.*, 47:1185 and 4218, 1987.
- Colcher et al., *PNAS*, 78:3199, 1981.
- 35

- 230 -

- Collins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:4917-4921, 1984.
- 5 Conn et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2628-2632, 1990.
- Connolly et al., *J. Biol. Chem.*, 264(33):20017-20024, 1989.
- 10 Corgon-Cardo et al., *Laboratory Investigation*, 63(6):832-840, 1990.
- Corvalen, *Cancer Immuno.*, 24:133, 1987.
- 15 Cotran et al., *J. Exp. Med.*, 164:661-666, 1986.
- Crea et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 75:5765, 1978.
- Croghan et al., *Cancer Res.*, 43:4980, 1983.
- 20 Croghan et al., *Cancer Res.*, 44:1954, 1984.
- Daar et al., *Transplantation*, 38(3):293-298, 1984.
- 25 Davies and Wlodawer, *FASEB J.*, 9:50-56, 1995.
- Davis & Preston, *Analytical Biochemistry*, 116(2):402-407, 1981.
- 30 de Krester et al., *Int. J. Cancer*, 37:705, 1986.
- De Vries et al., *Science*, 255:989-991, 1992.
- DeFranco, *Nature*, 352:754-755, 1991.
- 35

- 231 -

- deLeij et al., Bispecific antibodies and targeted cellular cytotoxicity, Romet-Lemonne et al., p. 249, 1991.
- 5 Denekamp, et al., *Brit. J. Cancer*, 461:711-720, 1982.
- Denekamp, *Cancer Meta. Rev.*, 9:267-282, 1990.
- Denekamp, *Prog. Appl. Microcirc.*, 4:28-38, 1984.
- 10 Detmar et al., *J. Exp. Med.*, 180:1141-1146, 1994.
- Dewerchin et al., *Blood*, 78(4):1005-1018, 1991.
- 15 Di Scipio et al., *Biochemistry*, 16:5253-5260, 1977.
- Dillman et al., *Antibody, Immunocon. Radiopharm.*, 1:65-77, 1988.
- 20 Dippold et al., *PNAS*, 77:6115, 1980.
- Dixon et al., *Mol. & Cell Biol.*, 7:4896-4902, 1989.
- Duijvestijn et al., *J. Immunol.*, 138:713-719, 1987.
- 25 Dunham & Stewart, *J. Natl. Cancer Inst.*, 13:1299-1377, 1953.
- Dustin et al., *J. Immunol.*, 137:245-254, 1986.
- 30 Dvorak et al., *J. Exp. Med.*, 174:1275-1278, 1991.
- Dvorak et al., *Cancer Cells*, 3(3):77-85, 1991.
- 35 Edelman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1513-1517, 1993.

- 232 -

- Edgington et al., *Thrombosis and Haemostasis*, 66(1):67-79, 1991.
- Ellis et al., *Histopathol.*, 8:501, 1984.
- 5 Embleton et al., *Br. J. Cancer*, 63(5):670-674, 1991.
- Epenetos et al., *Cancer Res.*, 46:3183-3191, 1986.
- 10 Epenetos et al., *Lancet*, Nov. 6, 2:1000-1004, 1982.
- Fair et al., *J. Biol. Chem.*, 262, 11692-11698, 1987.
- Farrans et al., *Lancet*, 2:397, 1982.
- 15 Febbraio and Silverstein, *J. Biol. Chem.*, 265(30):18531-18537, 1990.
- Ferrara et al., *J. Cell. Biochem.*, 47:211-218, 1991.
- 20 Ferrara et al., *Endocrine Reviews*, 13(1):18-32, 1992.
- Fisher et al., *Thrombosis Research*, 48:89-99, 1987.
- 25 Flavell et al., *Br. J. Cancer*, 65:545-551, 1992.
- Flavell et al., *Br. J. Cancer*, 64(2):274-280, 1991.
- Folkman, *Adv. Cancer Res.*, 43:175-230, 1985a.
- 30 Folkman et al., *Ann. Surg.*, 214(4):414-427, 1991.
- Folkman, In: Important Advances in Oncology, Part I,
DeVita et al. (Eds.), JB Lippincott, Philadelphia, pp.
35 42-62, 1985b.

- 233 -

Foster et al., *Virchows Arch. (Pathol. Anat. Histopathol.)*, 394:295, 1982.

Foster et al., *Human Pathol.*, 15:502 1984.

5

Fox, et al., *J. Biol. Resp.*, 9:499-511, 1990.

Frelinger III et al., *J. Biol. Chem.*, 266(26):17106-17111, 1991.

10

Frelinger III et al., *J. Biol. Chem.*, 265(11):6346-6352, 1990.

French et al., *Cancer Res.*, 51:2358-2361, 1991.

15

Gailani and Broze, Jr., *Science*, 253:909-912, 1991.

Galfre et al., *Methods Enzymol.*, 73:1-46, 1981.

20 Gallagher et al., *J. Surg. Res.*, 40:159, 1986.

Galland et al., *????????*, 1233-1240, 1993.

Gangopadhyay et al., *Cancer Res.*, 45:1744, 1985.

25

Gefter et al., *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.

Geppert et al., *Immunological Reviews*, 117:5-66, 1990.

30 Ghetie et al., *Cancer Res.*, 51:5876-5880, 1991.

Ghose, *CRC Critical Review in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 3:262-359, 1982.

35 Ghose & Blair, *CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 3:262-359, 1987.

- 234 -

- Gibbons, In: *J.D.Gibbons* (ed.), "Nonparametric methods for quantitative analysis," pp. 160, New York: Holt, Rinehart and Winston. 1976.
- 5 Gitoy-Goren et. al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 190:702-, 1993
- Glassy et al., *PNAS*, 80:63227, 1983.
- 10 Glennie et al., *J. Immunol.*, 141(10):3662-3670, 1988.
- Glennie et al., *J. Immunol.*, 139:2367-2375, 1987.
- 15 Goding, In: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., Academic Press, Orlando, FL, pp. 60-61, 65-66, 71-74, 1986.
- Gomez-Pinilla and Cotman, *Neuroscience*, 49:771-780, 1992.
- 20 Gosset et al., *Int Arch Allergy Immunol*, 106(1):69-77, 1995.
- Gougos et al., *Int. Immunol.*, 4:83-92, 1992.
- 25 Gougos & Letarte, *J. Immunol.*, 141:1925-1933, 1988.
- Griffin et al., *Treat. Res.*, 37:433-455, 1988b.
- 30 Griffin et al., *Proc. 2nd Conf. on Radioimmunodetection & Therapy of Cancer*, 82, 1988a.
- Groenewegen et al., *Nature*, 316:361-363, 1985.
- Groves et al., *Br J Dermatol*, 124(2):117-23, 1991.
- 35 Gusterson et al., *Br. J. Cancer*, 58:453, 1988.

- 235 -

- Hagemeier et al., *Int. J. Cancer*, 38:481-488, 1986.
- Hakkert et al., *Blood*, 78(10):2721-6, 1991.
- 5 Hammerling, *Transplant. Rev.*, 30:64-82, 1976.
- Hatley et al., *Thrombosis Research*, 45(5):485-495, 1987.
- Hayes et al., *J. Clin. Invest.*, 75:1671, 1985.
- 10 Hayward et al., *Biological Chemistry*, 266(11):7114-7120, 1991.
- Hendler et al., *Trans. Assoc. Am. Physicians*, 94:217,
- 15 1981.
- Herblin and Gross, *Angiogenesis: Key Principles - Science - Technology - Medicine*, 214-218, 1992.
- 20 Hess et al., *Transplantation*, 6:1232-1240, 1991.
- Heynen et al., *J. Clin. Invest.*, 94:1098-1112, 1994.
- Horan Hand et al., *Cancer Res.*, 45:2713, 1985.
- 25 Howard et al., *Developmental Biology*, 146:325-338, 1991.
- Huang et al., *Anticancer Research*, 13:887-890, 1993.
- 30 Imai et al., *JNCI*, 68:761, 1982.
- Imam et al., *J. Immunobiol*, 1984.
- Inouye et al., *Nucleic Acids Res.*, 13:3101-3109, 1985.
- 35 Jain, *Cancer Meta. Rev.*, 9(3):253-266, 1990.

- 236 -

- Jakeman et al., *J. Clin. Invest.*, 89:244-253, 1992.
- Johnson & Reithmuller, *Hybridoma*, 1:381, 1982.
- 5 Johnson et al., *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1:246, 1981
- June et al., *Molecular Cell Biology*, 12:4472-4481, 1987.
- June et al., *Immunology Today*, 11(6):211-216, 1990.
- 10 Jutila et al., *J Exp Med*, 175(6):1565-73, 1992.
- Juweid et al., *Cancer Res.*, 52:5144-5153, 1992.
- 15 Kabawat et al., *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 4:245, 1985.
- Kabawat et al., *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 4:265, 1983.
- Kandel et al., *Cell*, 66:1095-1104, 1991.
- 20 Kantor et al., *Hybridoma*, 1:473, 1982.
- Karasek, *J. Invest. Derm.*, 93(2):335-385, 1989.
- 25 Keelan et al., *Am J Physiol*, 266(1 Pt 2) pH278-90, Jan 1994a.
- Keelan et al., *J Nucl Med*, 35(2):276-81, Feb 1994b.
- 30 Kennel et al., *Cancer Res.*, 51:1529-1536, 1991.
- Kim et. al., *Growth Factors*, 7:53-64, 1992.
- Kim et al., *Nature*, 362:841-844, 1993.
- 35 Kimura et al., *Immunogenetics*, 11:373-381, 1983.

- 237 -

- Kinsel et al., *Cancer Res.*, 49:1052, 1989.
- Kishimoto et al., *Blood*, 78(3):805-11, 1991.
- 5 Kisiel, *J. Biol. Chem.*, 254(23):12230-12234, 1979.
- Kjeldsen et al., *2nd Int. Wkshop of MAbs & Breast Cancer*, San Fran., Nov., 1986.
- 10 Klagsbrun & Folkman, Angiogenesis Handook of Experimental Pharmacology, Vol. 95, Sporn & Roberts, Springer-Verlag, Berlin, pp. 549-586, 1990.
- Kohler & Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975.
- 15 Kohler & Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976.
- Kondo et al., *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 194(3):1234-1241, 1993.
- 20 Krishnaswamy et al., *J. Biol. Chem.*, 267(36):26110-26120, 1992.
- Krishnaswamy et al., *J. Biol. Chem.*, 267(33):23696-23706, 1992.
- 25 Kufe et al., *Hybridoma*, 3:223, 1984.
- Lan et al., *Cancer Res.*, 44:1954, 1984.
- 30 Lan et al., *Cancer Res.*, 45:305, 1985.
- Lee et al., *Methods in Enzymology*, 237:146-164, 1994.
- 35 Leith et al., *British J. Cancer*, 66(2):345-8, 1992.

- 238 -

- Lemkin et al., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 3:47, 1984.
- Leung et al., *Science*, 246:1306-1309, 1989.
- 5 Leydem et al., *Cancer*, 57:1135, 1986.
- LoBuglio et al., *JNCI*, 80:932, 1988.
- Logan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3655-3659,
10 1984.
- Loop et al., *Int. J. Cancer*, 27:775, 1981.
- Lord et al., In: Genetically Engineered Toxins, Frank
15 (Ed.), M. Dekker Publ., p. 183, 1992.
- Lowder et al., *Blood*, 69:199-210, 1987.
- Lowe et al., *Immunol Lett.*, 12:263-269, 1986.
20
- Lowy et al., *Cell*, 22:817, 1980.
- Maeda et al., *J. Invest. Derm.*, 97:183-189, 1991.
- 25 Manabe et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 104(3):445-454, 1984.
- Mandeville et al., *Cancer Detect. Prev.*, 10:89, 1987.
- Mann, *TIBS* 12, 229-233, 1987.
30
- Mason & Williams, *Biochem J*, 187:1-20, 1980.
- Massoglia et al., *J. Cell. Phys.*, 132:531-537, 1987.
- 35 Masuko et al., *Cancer Res.*, 44:2813, 1984.

- 239 -

- Mattes et al., *PNAS*, 81:568, 1984.
- Mazzocchi et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 32:13-21, 1990.
- 5 McDicken et al., *Br. J. Cancer*, 52:59, 1985.
- Menard et al., *Cancer Res.*, 63:1295, 1983.
- 10 Messing et al., Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA, Editor A. Walton, Elsevier, Amsterdam, 1981.
- Metzelaar et al., *Blood*, 79(2):372-379, 1992.
- 15 Metzelaar et al., *J. Biol. Chem.*, 266(5):3239-3245, 1991.
- Mignatti et al., *J. Cell. Biol.*, 113:1193-1201, 1991.
- 20 Millauer et al., *Cell*, 72:835-846, 1993.
- Miotti et al., *Cancer Res.*, 65:826, 1985.
- Miotti et al., *Int. J. Cancer*, 39:297, 1987.
- 25 Montefort et al., *Eur Respir J*, 5(7):815-23, 1992.
- Moroi and Aoki, *J. Biol. Chem.*, 251(19):5956-5965, 1976.
- 30 Morrissey et al., *Blood*, 81:734-744, 1993.
- Morrissey et al., *Cell*, 50:129-135, 1987.
- Morrissey et al., *Thrombosis Res.*, 52:247-261, 1988.
- 35 Moughal et al., *J Periodontal Res*, 27(6):623-30, 1992.

- 240 -

- Mulligan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072, 1981.
- Mulligan et al., *J. Clin. Invest.*, 88:1396-1406, 1991
- 5 Munz et al., *J. Nucl. Med.*, 27:1739, 1986.
- Murray et al., *Radio. Onc.*, 16:221-234, 1989.
- 10 Nabel et al., *Nature*, 362:844-846, 1993.
- Nakamura, *Prog. Growth Factor Res.*, 3:67-86, 1991.
- Nelson, 1991.
- 15 Nemerson, *Blood*, 71(1):1-8, 1988.
- Neumann et al., *Arch Dermatol*, 130(7):879-83, 1994.
- 20 Nieuwenhuis et al., *Blood*, 70(3):838-845, 1987.
- Nishikawa et al., *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 324:131-139, 1992.
- 25 Nitta et al., *Lancet*, 335:368-371, 1990.
- Nolan & Kennedy, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1040:1-11, 1990.
- 30 Norton et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 195(1):250-8, 1993.
- O'Connell et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 90:154-159, 1992.
- 35 O'Connell et al., *J. Immunol.*, 144(2):521-525, 1990.

- 241 -

- O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1527, 1981.
- Ogawa et al., *British J. Haematology*, 75:517-524, 1990.
- 5 Ohuchida et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 103(15):4597-4599, 1981.
- Oi & Morrison, *Mt. Sinai J. Med.*, 53(3):175-180, 1986.
- 10 Olander et al., *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 175(1):68-76, 1991.
- Olofsson et al., *Blood*, 84(8):2749-58, 1994.
- 15 Osborn et al., *Cell*, 59:1203-1211, 1989.
- Osterud et al., *Thrombosis Res.*, 42:323-329, 1986.
- Paborsky et al., *J. Biol. Chem.*, 266(32):21911-21916,
20 1991.
- Palleroni et al., *Int. J. Cancer*, 49:296-302, 1991.
- Patt et al., *Cancer Bull.*, 40:218, 1988.
25
- Paul et al., *Hybridoma*, 5:171, 1986.
- Paulus, *Behrini Inst. Mitt.*, 78:118-132, 1985.
- 30 Perez et al., *J. Exp. Med.*, 163:166-178, 1986.
- Perez et al., *J. Immunol.*, 137:2069-2072, 1986.
- Perez et al., *Nature*, 316:354-356, 1985.
35
- Perkins et al., *Eur. J. Nucl. Med.*, 10:296, 1985.

- 242 -

- Pietersz et al., *Antibody, Immunoconj. Radiopharm.*, 1:79-103, 1988.
- 5 Pimm et al., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 118:367-370, 1992.
- Plate et al., *Cancer Res.*, 53:5822-5827, 1993.
- 10 Plate et al., *Nature*, 359:845-848, 1992.
- Pober et al., *J. Exp. Med.*, 157:1339-1353, 1991.
- Poels et al., *J. Natl. Cancer Res.*, 44:4528, 1984.
- 15 Poels et al., *J. Natl. Cancer*, 76:781, 1986.
- Pukrittayakamee et al., *Mol. Biol. Med.*, 1:123-135, 1983.
- 20 Qian et al., *Cancer Res.*, 140:3250, 1991.
- Rao and Rapaport, *Biochemistry*, 85:6687-6691, 1988.
- Rasmussen et al., *Breast Cancer Res. Treat.*, 2:401, 1982.
- 25 Rehemtulla et al., *Thrombosis and Haemostasis*, 65(5):521-527, 1991.
- 30 Reilly et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 164:736-743, 1989.
- Reisfeld et al., *Melanoma Antigens and Antibodies*, p. 317, 1982.
- 35 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack Publishing Company, 1980.

- 243 -

- Rettig et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10832-10836, 1992.
- Riva et al., *Int. J. Cancer*, 2:114, 1988
- 5 Rivoltini et al., *3rd Int. Conf. Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity*, 1992.
- Rowinsky, *Clinical Investigation*, Abstracts from
10 Chemotherapy foundation symposium X. Innovative cancer chemotherapy for tomorrow, pp. 6-9, 1992.
- Ruco et al., *Am. J Pathol.*, 137(5):1163-1171, 1990.
- 15 Ruf and Edgington, *Thrombosis and Haemostasis*, 66(5):529-533, 1991.
- Ruf et al., *J. Biol. Chem.*, 266(24):15719-15725, 1991.
- 20 Ruf et al., *J. Biol. Chem.*, 266(4):2158-2166, 1991.
- Ruf et al., *JBC*, 266:2158-2166, 1991.
- Ruf & Edgington, *FASEB J.*, 8:385-390, 1994.
- 25 Ruther et al., *EMBO J.*, 2:1791, 1983.
- Safran et al., *Oncogene*, 5:635-643, 1990.
- 30 Sainsbury et al., *Lancet*, 1:364, 1985.
- Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989.
- 35 Sands, *Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals*, 1:213-226, 1988.

- 244 -

- Santerre et al., *Gene*, 30:147, 1984.
- Saxton et al., *Hybridoma*, 1:433, 1982.
- 5 Scarpati et al., *Biochemistry*, 26:5234-5238, 1987.
- Schlingemann et al., *Lab. Invest.*, 52:71-76, 1985.
- Schlingemann et al., *Lab. Invest.*, 62:690-696, 1990.
- 10 Schlom et al., *Adv. Cancer Res.*, 43:143, 1985.
- Schutt et al., *Immunol. Lett.*, 19:321-328, 1988.
- 15 Schweigerer et al., *Nature*, 325:257-259, 1987.
- Sedmak et al., *Transplantation*, 58(12):1379-85, 1994.
- Segal et al., 1992.
- 20 Senger et al., *Cancer and Metastasis Reviews*, 12:303-324, 1993.
- Senger et al., *Cancer Research*, 50:1774-1778, 1990.
- 25 Shankar et al., *J. Biol. Chem.*, 269(19):13936-13941, 1994.
- Shen and Tai, *J. Biol. Chem.*, 261(25):11585-11591, 1986.
- 30 Shepard et al., *J. Clin. Immunol.*, 11:117-127, 1991.
- Shockley et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 617:367-382, 1991.
- 35 Shrestha et al., *Eur. J. Cancer B. Oral. Oncol.*, 30B(6):393-9, 1994.

- 245 -

- Shweiki et al., *Nature*, 359:843-847, 1992.
- Silber et al., *J Clin Invest*, 93(4):1554-63, 1994.
- 5 Silverstein and Febbraio, *Blood*, 80(6):1470-1475, 1992.
- Sioussat et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 301(1):15-20, 1993.
- 10 Sloane, *Cancer*, 17:1786, 1981.
- Smith et al., *J. Virol.*, 46:584, 1983.
- Smith et al., 1989.
- 15 Smith et al., *Proc. Am. Soc. Clin. O. col.*, 6:250, 1987.
- Soule et al., *PNAS*, 80:1332, 1983
- 20 Span et al., *Immunology*, 72(3):355-60, 1991.
- Spicer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:5148-5152, 1987.
- 25 Sporn et al., *Blood*, 81(9):2406-12, 1993.
- Staerz et al., *Nature*, 314(6012):628-631, 1985.
- Stavrou, *Neurosurg. Rev.*, 13:7, 1990.
- 30 Stefanik et al., *Cancer Research*, 51:5760-5765, 1991.
- Steinberg et al., *J Heart Lung Transplant*, 13(2):306-18, Mar-Apr 1994.
- 35

- 246 -

- Stern et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:4119-4123, 1982.
- 5 Stern et al., *J. Biol. Chem.*, 260(11):6717-6722, 1985.
- Stevenson et al., *Chem. Immunol.*, 48:126-166, 1990.
- Street et al., *Cell. Immunol.*, 120:75-81, 1989.
- 10 Stuhlmiller et al., *Hybridoma*, 1:447, 1982.
- Sugama et al., *J. Cell Biol.*, 119(4):935-944, 1992.
- Sunderland et al., *Cancer Res.*, 44:4496, 1984.
- 15 Szybalska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:2026, 1962.
- Szymendera, *Tumour Biology*, 7:333, 1986.
- 20 Takahashi et al., *Cancer*, 61:881, 1988.
- Teramoto et al., *Cancer*, 50:241, 1982.
- 25 Tessler et al., *J. Biol. Chem.*, 269(17):12456-12461, 1994.
- Thieme et al., *Diabetes*, 44(1):98-103, 1995.
- 30 Thompson et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 70:409, 1983.
- Thor et al., *Cancer Res.*, 46:3118, 1986
- Thorpe et al., *Cancer Res.*, 48:6396-6403, 1988.
- 35 Ting et al., *J. Immunol.*, 141:741-748, 1988.

- 247 -

- Tischer et al., *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*,
165(3):1198-1206, 1989.
- 5 Tischer et al., *J. Biol. Chem.*, 266(18):11947-11954,
1991.
- Titus et al., *J. Immunol.*, 138:4018-4022, 1987.
- 10 Tomiyama et al., *Blood*, 79(9):2303-2312, 1992.
- Tone et al., *J. Biochem.*, 102(5):1033-1941, 1987.
- Tsuji et al., *Cancer Res.*, 45:2358, 1985.
- 15 Tuominen and Kallioinen, *J. Cutan. Pathol.* 21(5):424-9,
1994.
- Tutt et al., *Eur. J. Immunol.*, 21:1351-1358, 1991.
- 20 Ugarova et al., *J. Biol. Chem.*, 268(28):21080-21087,
1993.
- Ulich et al., *Inflammation*, 18(4):389-98, 1994.
- 25 Vaickus et al., *Cancer Invest.*, 9:195-209, 1991.
- Vaisman et al., *J. Biol. Chem.*, 265(32):19461-19466,
1990.
- 30 Van Heeke et al., *J. Biol. Chem.*, 264:5503-5509, 1989.
- Van Duk et al., *Int. J. Cancer*, 43:344-349, 1989.
- Veale et al., *Arthritis Rheum*, 36(7):893-900, 1993.
- 35 Venkateswaran et al., *Hybridoma*, 11(6):729-739, 1992.

- 248 -

- Vitetta et al., *Cancer Res.*, 15:4052-4058, 1991.
- von Asmuth et al., *Eur J Immunol*, 22(10):2519-26, 1992.
- 5 Wagener et al., *Int. J. Cancer*, 33:469, 1984.
- Wang et al., *Int. J. Cancer*, 54:363-370, 1993.
- Wang et al., *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*,
10 177(1):286-291, 1991.
- Warr et al., *Blood*, 75:1481-1489, 1990.
- Watanabe et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,
15 86:9456-9460, 1989.
- Wawrzynczak & Thorpe, "Methods for preparing
immunotoxins: effect of the linkage on activity and
stability", in: Immunoconjugates.: Antibody conjugates
20 in radioimaging and therapy of cancer, Vogel (ed), New
York, Oxford University Press, pp. 28-55, 1987.
- Weiner et al., *Cancer Res.*, 49:4062-4067, 1989.
- 25 Weiss et al., *Blood*, 73:968-975, 1989.
- Whittle et al., *Nature*, 292:472-474, 1981.
- Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:3567, 1980.
30
- Wigler et al., *Cell*, 11:223, 1977.
- Wildgoose et al., *Blood*, 80:25-28, 1992.
- 35 Williams and Esnouf, *Biochem. J.*, 84:52-62, 1962.

- 249 -

- Wilson et al., *Int. J. Cancer*, 28:293, 1981.
- Wiman and Collen, *Eur. J. Biochem.*, 78:19-26, 1977.
- 5 Wiman, *Biochem. J.*, 191:229-232, 1980.
- Winter & Milstein, *Nature*, 349:293-299, 1991.
- Woodbury et al., *PNAS*, 77:2183, 1980.
- 10 Wu et al., *Int. J. Pharm.*, 12:235-239, 1990.
- Xu et al., *J. Biol. Chem.*, 267(25):17792-17803, 1992.
- 15 Yamaguchi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:484-488, 1994.
- Yamaue et al., *Biotherapy*, 2:247-259, 1990.
- 20 Zamarron et al., *J. Biol. Chem.*, 266(24):16193-16199, 1991.
- Zhang et al., *Int J Cancer*, 59(6):823-9, 1994.

- 250 -

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

5

(i) APPLICANT:

NAME: BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF
TEXAS SYSTEM

STREET: 201 West 7th Street

CITY: Austin

10

STATE: Texas

COUNTRY: United States of America

POSTAL CODE: 78701

TELEPHONE NO: (512)499-4462

TELEFAX: (512)499-4523

15

and

NAME: THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE

STREET: 10666 North Torrey Pines Road

20

CITY: LaJolla

STATE: California

COUNTRY: United States of America

POSTAL CODE: 92037

25

(ii) INVENTORS: THORPE, Philip E.

EDGINGTON, Thomas S.

(iii) TITLE OF INVENTION: METHODS AND COMPOSITIONS
FOR THE SPECIFIC

30

COAGULATION OF VASCULATURE

(iv) NUMBER OF SEQUENCES: 32

(v) CORRESPONDENCE ADDRESS:

35

(A) ADDRESSEE: Arnold, White & Durkee

(B) STREET: P. O. Box 4433

- 251 -

- (C) CITY: Houston
- (D) STATE: Texas
- (E) COUNTRY: USA
- (F) ZIP: 77210

5

(vi) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS, ASCII

10

(vii) CURRENT APPLICATION DATA:

- (A) APPLICATION NUMBER: PCT/US95/07439
- (B) FILING DATE: 07-JUN-1995
- (C) CLASSIFICATION: Unknown

15

(viii) PRIOR APPLICATION DATA:

- (A) APPLICATION NUMBER: US 08/273,567
- (B) FILING DATE: 11-JUL-1994

20

(ix) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

- (A) NAME: PARKER, DAVID L.
- (B) REGISTRATION NUMBER: 32,165
- (C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: UTFD433P--

25

(x) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

- (A) TELEPHONE: (512) 418-3000
- (B) TELEFAX: (713) 789-2679
- (C) TELEX: 79-0924

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 252 -

- (A) LENGTH: 27 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

5

- (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
 - (A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

10

GTCATGCCAT GGCCTCAGGC ACTACAA

27

- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

15

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 32 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

20

- (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
 - (A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

25

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

TGACAAGCTT ATTCTCTGAA TTCCCCCTTT CT

32

- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

30

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 47 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

35

- 253 -

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

5

GTCATGCCAT GGCCCTGGTG CCTCGTGCTT CTGGCACTAC AAATACT 47

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 38 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

15

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

GTCATGCCAT GGCCTGCTCA GGCCTACAA ATACTGTG 38

25 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 50 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

30

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

35

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

- 254 -

GTCATGCCAT GGCCCTGGTG CCTCGTGGTT CTTGCGGCAC TACAAATACT 50

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

5

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 35 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

10 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

15 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

TGACAAGCTT AGCATTCTCT GAATTCCCCC TTTCT

35

20 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 50 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

25 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

GTCATGCCAT GGCCCTGGTG CCTCGTGGTT GCGGAGGCGG TGGATCAGGC 50

35

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

- 255 -

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 36 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

5 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

10 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

AGTATTTGTA GTGCCTGAGG ATCCGCCACC TCCACT

36

15 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 45 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

20 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

25

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

GGAGGCGGTG GATCAGGCGG TGGAGGTAGT GGAGGTGGCG GATCC

45

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 17 base pairs

35 (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

- 256 -

(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

5 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:
GTCATGCCAT GGCCCTG 17

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
10 (A) LENGTH: 32 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

15 (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:
20 TGACAAGCTT ATTCTCTGAA TTCCCCCTTT CT 32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:
25 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 50 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

30 (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
(A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:
35 GTCATGCCAT GGCCCTGGTG CCTCGTGGTT CTTGCGGCAC TACAAATACT 50

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 53 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

- (A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

CGCGGATCCA CCGCCACCAG ATCCACCGCC TCCTTCTCTG AATCCCCCTT TCT

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 44 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

- 258 -

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

5

CGCGGATCCG GCGGTGGAGG CTCTTCAGGC ACTACAAATA CTGT

44

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 31 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

15

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

TGACAAGCTT ATTCTCTGAA TTCCCCTTTC T

31

25 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 50 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

30

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

35

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

- 259 -

GTCATGCCAT GGCCCTGGTG CCTCGTGGTT CTTGCGGCAC TACAAATACT 50

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

5

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 31 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

10 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

15 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

TGACAAGCTT ATTCTCTGAA TTCCCCTTTC T 31

20 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 44 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

25 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

(A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

GTCATGCCAT GGCCCTGGTG CCTCGTGGTT GCACTACAAA TACT 44

35

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

- 260 -

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 34 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

- (A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

TGACAAGCTT AGCATCTCT GAATCCCCT TTCT

34

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 19 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

- (A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

CAAGTTCAGC CAAGAAAAC

19

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 36 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single

- (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid
 - (A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

ACACTTTATT ATCGGAAATC TTCAGCTTCA GGAAAG

36

- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 657 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:

TCAGGCACTA CAAATACTGT GGCAGCATAT AATTAACTT GGAAATCAAC TAATTTCAG

60

ACAATTTTGG AGTGGGAACC CAAACCCGTC AATCAAGTCT AACTGTTCA AATAAGCACT

120

180 AAGTCAGGAG ATTGGAAGAAG CAAATGCTTT TACACAACAG ACACAGAGTG TGACCTCACC
240 GACGAGATTG TGAAGGATGT GAAGCAGACG TACTTGGCAC GGTCTTCTC CTACCCGGCA
300 5 GGGAAATGTGG AGAGCACCGG TTCTGCTGGG GAGCCTCTGT ATGAGAACTC CCCAGAGTTC
360 ACACCTTACC TGGAGACAAA CCTCGGACAG CCAACAATTC AGAGTTTGA ACAGGTGGGA
420 ACAAAAGTGA ATGTGACCGT AGAAGATGAA CGGACTTTAG TCAGAAGGAA CAACACTTTC
480 CTAAGCCTCC GGGATGTTTT TGGCAAGGAC TTAATTATA CACTTTATTA TTGGAAATCT
540 TCAAGTTCAG GAAAGAAAAC AGCCAAAACA AACACTAATG AGTTTTTGAT TGATGTGGAT
600 15 AAAGGAGAAA ACTACTGTTT CAGTGTTCAA GCAGTGATTC CCTCCCGAAC AGTTAACCGG
657 AAGAGTACAG ACAGCCCGGT AGAGTGTATG GGCCAGGAGA AAGGGGAATT CAGAGAA

20 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:23:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 219 amino acids

- 263 -

(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS:
(D) TOPOLOGY: linear

5 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:23:

1	Ser	Gly	Thr	Thr	Asn	Thr	Val	Ala	Ala	Tyr	Asn	Leu	Thr	Trp	Lys	Ser	15
10	Thr	Asn	Phe	Lys	Thr	Ile	Leu	Glu	Trp	Glu	Pro	Lys	Pro	Val	Asn	Gln	30
	Val	Tyr	Thr	Val	Gln	Ile	Ser	Thr	Lys	Ser	Gly	Asp	Trp	Lys	Ser	Lys	45
15	Cys	Phe	Tyr	Thr	Thr	Asp	Thr	Glu	Cys	Asp	Leu	Thr	Asp	Glu	Ile	Val	60
	Lys	Asp	Val	Lys	Gln	Thr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Val	Phe	Ser	Tyr	Pro	Ala	75
20																	80
	Gly	Asn	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Leu	Tyr	Glu	Asn	95

-264-

Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr
 100 105 110

Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu
 115 120 125

Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg
 130 135 140

Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser
 145 150 155 160

Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu
 165 170 175

Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val
 180 185 190

Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu
 195 200 205

Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu
 210 215

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:24:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1947 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:24:

TGCAGCTGCC	TGGCTGCCCTG	GCCCTGGCTG	CCCTGTGTAG	CCTTGTGCAC	AGCCAGCATG	60
TGTTCCCTGGC	TCCTCAGCAA	GCACGGTCGC	TGCTCCAGCG	GGTCCGGCGA	GCCAACACCT	120
TCTTGGAGGA	GGTGCGCAAG	GGCAACCTAG	AGCGAGAGTG	CGTGGAGGAG	ACGTGCAGCT	180
ACGAGGAGGC	CTTCGAGGCT	CTGGAGTCCT	CCACGGCTAC	GGATGTGTTC	TGGGCCAAGT	240
ACACAGCTTG	TGAGACAGCG	AGGACGCCCTC	GAGATAAGCT	TGCTGCATGT	CTGGAAGGTA	300
ACTGTGCTGA	GGGTCTGGGT	ACGAACTACC	GAGGGCATGT	GAACATCACC	CGGTCAGGCA	360

- 266 -

TTGAGTGCCA GCTATGGAGG AGTCGCTACC CACATAAGCC TGAATCAAC TCCACTACCC 420

ATCCTGGGGC CGACCCTACAG GAGAAATTTCT GCCGCAACCC CGACAGCAGC AACACGGGAC 480

5 CCTGGTGCTA CACTACAGAC CCCACCGTGA GGAGGCAGGA ATGCAGCATC CCTGTCTGTG 540

GCCAGGATCA AGTCACTGTA GCGATGACTC CACGCTCCGA AGGCTCCAGT GTGAATCTGT 600

CACCTCCATT GGAGCAGTGT GTCCCTGATC GGGGGCAGCA GTACCAGGGG CGCCTGGCGG 660

10 TGACCACACA TGGGCTCCCC TGCCCTGGCCT GGGCCAGCGC ACAGGCCAAG GCCCTGAGCA 720

AGCACCAGGA CTTCAACTCA GCTGTGCAGC TGGTGGAGAA CTCTGCCGC AACCCAGACG 780

15 GGGATGAGGA GGGCGTGTGG TGCTATGTGG CCGGGAAGCC TGGCGACTTT GGGTACTGCG 840

ACCTCAACTA TTGTGAGGAG GCCGTGGAGG AGGAGACAGG AGATGGGCTG GATGAGGACT 900

20 CAGACAGGC CATCGAAGG CGTACCGCCA CAAGTGAGTA CCAGACTTTC TTCAATCCGA 960

GGACCTTTGG CTCGGGAGAG GCAGACTGTG GGCTGCGACC TCTGTTCGAG AAGAAGTCGC 1020

TGGAGGACAA AACCGAAAGA GAGCTCCTGG AATCCTACAT CGACGGGCGC ATTGTGGAGG 1080

-267-

	GCTCGGATGC AGAGATCGGC ATGTCACCTT GGCAGGTGAT GCTTTTCCGG AAGAGTCCCC	1140
	AGGAGCTGCT GTGTGGGGCC AGCCTCATCA GTGACCGCTG GGTCCCTCACC GCCGCCCACT	1200
5	GCCTCCTGTA CCCGCCCTGG GACAAGAACT TCACCGAGAA TGACCTTCTG GTGCGCATTG	1260
	GCAAGCACTC CCGCACCCAGG TACGAGCGAA ACATTGAAAA GATATCCATG TTGGAAAAGA	1320
	TCTACATCCA CCCCAGGTAC AACTGGCGGG AGAACCTGGA CCGGGACATT GCCCTGATGA	1380
10	AGCTGAAGAA GCCTGTTGCC TTCAGTGAAT ACATTACACC TGTGTGTCTG CCCGACAGGG	1440
	AGACGGCAGC CAGCTTGCTC CAGGCTGGAT ACAAGGGCG GGTGACAGGC TGGGGCAACC	1500
15	TGAAGGAGAC GTGGACAGCC AACGTTGGTA AGGGGCAGCC CAGTGTCTCTG CAGGTGGTGA	1560
	ACCTGCCCAT TGTGGAGCGG CCGGTCTGCA AGGACTCCAC CCGGATCCGC ATCACTGACA	1620
	ACATGTTCTG TGCTGGTTAC AAGCCTGATG AAGGAAACG AGGGGATGCC TGTGAAGGTG	1680
20	ACAGTGGGG ACCCTTTGTC ATGAAGAGCC CCTTTAACA CCGCTGGTAT CAAATGGGCA	1740
	TGGTCTCATG GGGTGAAGGC TGTGACCGGG ATGGGAAATA TGGCTTCTAC ACACATGTGT	1800

TCCGCCCTGAA GAAGTGGATA CAGAAGGTCA TTGATCAGTT TGGAGAGTAG GGGGCCACTC 1860
ATATTCTGGG CTCCTGGAAC CAATCCCGTG AAAGAAATTAT TTTTGTGTTT CTAAAACTAT 1920
5 GGTTCCCAAT AAAAGTGACT CTCAGCG 1947

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:25:

- 10 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 2462 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

15 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:25:

TCAACAGGCA GGGCAGCAC TGCAGAGATT TCATCATGGT CTCCCAGGCC CTCAGGCTCC 60
20 TCTGCCTTCT GCTTGGGCTT CAGGGCTGCC TGGCTGCAGG CGGGTCGCT AAGGCCTCAG 120
GAGGAGAAAC ACGGACATG CCGTGAAGC CGGGCCCTCA CAGAGTCTTC GTAACCCAGG 180

	AGGAAGCCCA CGCGGTCCTG CACCGGCGCC GGCGCGCCAA CGCGTTCCCTG GAGGAGCTGC	240
	GGCCGGGCTC CCTGGAGAGG GAGTGCAAGG AGGAGCAGTG CTCCTTCGAG GAGGCCCGGG	300
5	AGATCTTCAA GGACGCGGAG AGGACGAAGC TGTTCGGAT TTCTTACAGT GATGGGACC	360
	AGTGTGCCTC AAGTCCATGC CAGAAATGGG GCTCCTGCAA GGACCAGCTC CAGTCCCTATA	420
	TCTGCTTCTG CCTCCCTGCC TTCGAGGGCC GGAAGTGTGA GACGCACAAG GATGACCAGC	480
10	TGATCTGTGT GAACGAGAAC GGCGGCTGTG AGCAGTACTG CAGTGACCAC ACGGCACCA	540
	AGCGCTCCTG TCGGTGCCAC GAGGGTACT CTCTGCTGGC AGACGGGGTG TCCTGCACAC	600
15	CCACAGTTGA ATATCCATGT GGAAAAATAC CTATTCTAGA AAAAAGAAAT GCCAGCAAAC	660
	CCCAAGGCCG AATTGTGGGG GGCAAGGTGT GCGCCAAAGG GGAGTGTTCA TGGCAGGTCC	720
	TGTTGTGGT GAATGGAGCT CAGTTGTGTG GGGGGACCCT GATCAACACC ATCTGGGTGG	780
20	TCTCCGGGC CCACTGTTTC GACAAAATCA AGAACTGGAG GAACCTGATC GCGGTGCTGG	840
	GCGAGCACGA CCTCAGCGAG CACGACGGG ATGAGCAGAG CCGGCGGGTG GCGCAGGTCA	900

	TCATCCCCAG CACGTACGTC CCGGGCACCA CCAACCACGA CATCGCGCTG CTCCGCCCTGC	960
	ACCAGCCCCGT GGTCCCTCACT GACCATGTGG TGCCCCCTCTG CCTGCCCGAA CGGACGTTCT	1020
5	CTGAGAGGAC GCTGGCCCTC GTGCGCTTCT CATTGGTCAG CGGCTGGGC CAGCTGCTGG	1080
	ACCGTGGCG CACGGCCCTG GAGCTCATGG TGCTCAACGT GCCCGGCTG ATGACCCAGG	1140
	ACTGCCCTGCA GCAGTCACGG AAGTGGGAG ACTCCCCAAA TATCACGGAG TACATGTTCT	1200
10	GTGCCGGCTA CTCGGATGGC AGCAAGGACT CCTGCAAGG GGACAGTGA GGCCACATG	1260
	CCACCCACTA CCGGGGCACG TGTACCTGA CGGGCATCGT CAGCTGGGC CAGGGCTGG	1320
15	CAACCGTGG CCACTTTGG GTGTACACCA GGTCTCTCCA GTACATCGAG TGGCTGCAA	1380
	AGCTCATGCG CTCAGAGCCA CGCCCAGGAG TCCTCCTGCG AGCCCCATT CCCTAGCCCA	1440
	GCAGCCCTGG CCTGTGGAGA GAAAGCCAAG GCTGCCGTCGA ACTGTCTCTGG CACCAAATCC	1500
20	CATATATTCT TCTGCAGTTA ATGGGTTAGA GGAGGCATG GGAGGGAGG AGAGGTGGG	1560
	AGGGAGACAG AGACAGAAAC AGAGAGAGAC AGAGACAGAG AGAGACTGAG GGAGAGACTC	1620

-271-

1680 TGAGGACATG GAGAGAGACT CAAAGAGACT CCAAGATTCA AAGAGACTAA TAGAGACACA

1740 GAGATGGAAT AGAAAAGATG AGAGGCAGAG GCAGACAGGC GCTGGACAGA GGGGCAGGGG

1800 5 AGTGCCAAGG TTGTCTCTGGA GGCAGACAGC CCAGCTGAGC CTCCTTACCT CCCTTCAGCC

1860 AAGCCCCACC TGCACGTGAT CTGCTGGCCC TCAGGCTGCT GCTCTGCCCTT CATTGCTGGA

1920 GACAGTAGAG GCATGAACAC ACATGGATGC ACACACACAC ACGCCAATGC ACACACACAG

1980 10 AGATATGCAC ACACACGGAT GCACACACAG ATGATCACAC AGAGATACGC AAACACACCG

2040 ATGCACACGC ACATAGAGAT ATGCACACAC AGATGCACAC ACAGATATAC ACATGGATGC

2100 15 ACGCACATGC CAATGCACGC ACACATCAGT GCACACGGAT GCACAGAGAT ATGCACACAC

2160 CGATGTGCGC ACACACAGAT ATGCACACAC ATGGATGAGC ACACACACAC CAAGTGCGCA

2220 CACACACCGA TGTACACACA CAGATGCACA CACAGATGCA CACACACCGA TGCTGACTCC

2280 20 ATGTGTGCTG TCCTCTGAAG GCGGTTGTTT AGCTCTCACT TTTCTGGTTC TTATCCATT

2340 TCATCTTCAC TTCAGACAAT TCAGAAGCAT CACCATGCAT GGTTGGGAAT GCCCCAAAC

TCTCCCCCAA ATGTATTCT CCCTTCGCTG GGTGCCGGGC TGCACAGACT ATTCCCCACC 2400

TGCTTCCCAG CTTACAATA AACGGCTGCG TCTCCTCCGC ACACCTGTGG TGCCTGCCAC 2460

5 CC 2462

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:26:

- 10 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 1437 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:26:

ATGCAGCGCG TGAACATGAT CATGGCAGAA TCACCAAGCC TCATCACCAT CTGCCTTTTA 60

20 GGATATCTAC TCAGTGCTGA ATGTACAGTT TTTCTTGATC ATGAAAACGC CAACAAAT 120

CTGAATCGGC CAAAGAGGTA TAATTCAGGT AAATTGGAAG AGTTGTTC AAGGAACCTT 180

-273-

	GAGAGAGAAT GTATGGAAGA AAAGTGTAGT TTTGAAGAAC CACGAGAAGT TTTTGAAAAAC	240
	ACTGAAAAGA CAACTGAATT TTGGAAGCAG TATGTTGATG GAGATCAGTG TGAGTCCAAT	300
5	CCATGTTTAA ATGGCGGCAG TTGCAAGGAT GACATTAAAT CCTATGAATG TTGGTGTCCC	360
	TTTGGATTG AAGGAAAGAA CTGTGAATTA GATGTAACAT GTAACATTAA GAATGGCAGA	420
	TGCGAGCAGT TTTGTAAAAA TAGTGCTGAT AACAAAGGTGG TTTGCTCCTG TACTGAGGGA	480
10	TATCGACTTG CAGAAAACCA GAAGTCCTGT GAACCAAGCAG TGCCATTTC ATGTGGAAGA	540
	GTTTCTGTTT CACAAACTTC TAAGCTCACC CGTGCTGAGG CTGTTTTTCC TGATGTGGAC	600
15	TATGTAAATC CTA CTGAAGC TGA AACCAT TTTGATAACA TCACTCAAGG CACCCAATCA	660
	TTTAATGACT TCACTCGGGT TGTTGGTGGA GAAGATGCCA AACCAAGTCA ATTCCCTTGG	720
20	CAGGTTGTTT TGAATGGTAA AGTTGATGCA TTCTGTGGAG GCTCTATCGT TAATGAAAAA	780
	TGGATTGTAA CTGCTGCCCA CTGTGTTGAA ACTGGTGTTA AAATTACAGT TGTCGCAGGT	840
	GAACATAATA TTGAGGAGAC AGAACATACA GAGCAAAAGC GAAATGTGAT TCGAGCAATT	900

ATTCTCACC ACAACTACAA TGCAGCTATT AATAAGTACA ACCATGACAT TGCCCTTCTG 960

GAACTGGACG AACCCCTAGT GCTAAACAGC TACGTTACAC CTATTGCAAT TGCTGACAAG 1020

5 GAATACACGA ACATCTTCCT CAAATTGGA TCTGGCTATG TAAGTGGCTG GGCAAGAGTC 1080

TTCCACAAAG GGAGATCAGC TTTAGTTCTT CAGTACCCTA GAGTCCACT TGTTGACCGA 1140

GCCACATGTC TTCGATCTAC AAAGTTCACC ATCTATAACA ACATGTTCTG TGCTGGCTTC 1200

10 CATGAAGGAG GTAGAGATTC ATGTCAAGGA GATAGTGGG GACCCCATGT TACTGAAGTG 1260

GAAGGGACCA GTTCTTTAAC TGGAATTATT AGCTGGGGTG AAGAGTGTGC AATGAAAGGC 1320

15 AAATATGGAA TATATACCAA GGTATCCCGG TATGTCACT GGATTAAGGA AAAAACAAG 1380

CTCACTTAAT GAAAGATGGA TTTCCAAGGT TAATTCATTG GAATTGAAA TTAACAG 1437

20 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:27:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
- (A) LENGTH: 1126 base pairs

- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

5 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:27:

10	GGATTCTGAAG GCAAAAACCTG TGAATTATTC ACACGGAAGC TCTGCAGCCT GGACAAACGGG	60
	GACTGTGACC AGTTCTGCCA CGAGGAACAG AACTCTGTGG TGTGCTCCTG CGCCCGCGGG	120
	TACACCCCTGG CTGACAAACGG CAAGGCCTGC ATTCCCACAG GGCCCTACCC CTGTGGGAAA	180
	CAGACCCCTGG AACGCAGGAA GAGTCAGTG GCCCAGGCCA CCAGCAGCAG CGGGGAGGCC	240
15	CCTGACAGCA TCACATGGAA GCCATATGAT GCAGCCGACC TGGACCCAC CGAGAACCCC	300
	TTCGACCTGC TTGACTTCAA CCAGACGCAG CCTGAGAGGG GCGACAACAA CCTCACCAGG	360
	ATCGTGGGAG GCCAGGAATG CAAGGACGGG GAGTGTCCCT GGCAGGCCCT GCTCATCAAT	420
20	GAGGAAAACG AGGGTTTCTG TGGTGAACC ATTCTGAGCG AGTTCTACAT CCTAACGGCA	480
	GCCCACTGTC TCTACCAAGC CAAGAGATTC GAAGGGGACC GGAACACGGA GCAGGAGGAG	540

GGCGGTGAGG CCGTGACACGA GGTGGAGGTG GTCATCAAGC ACAACCGGTT CACAAAGGAG 600
ACCTATGACT TCGACATCGC CGTGCTCCGG CTCAAGACCC CCATCACCTT CCGCATGAAC 660
5 GTGGCGCCTG CCTGCCTCCC CGAGCGTGAC TGGGCCGAGT CCACGCTGAT GACGCAGAAG 720
ACGGGGATTG TGAGCGGCTT CGGGCGCACC CACGAGAAGG GCCGGCAGTC CACCAGGCTC 780
AAGATGCTGG AGGTGCCCTA CGTGGACCGC AACAGCTGCA AGCTGTCCAG CAGCTTCATC 840
10 ATCACCACAGA ACATGTTCTG TGCCGGCTAC GACACCAAGC AGGAGGATGC CTGCCAGGGG 900
GACAGCGGGG GCCCGCACGT CACCCGCTTC AAGGACACCT ACTTCGTGAC AGGCATCGTC 960
15 AGCTGGGGAG AGGGCTGTGC CCGTAAGGGG AAGTACGGA TCTACACCAA GGTCACCGCC 1020
TTCCTCAAGT GGATCGACAG GTCCATGAAA ACCAGGGGCT TGCCCAAGGC CAAGAGCCAT 1080
GCCCCGGAGG TCATAACGTC CTCTCCATTA AAGTGAGATC CCACTC 1126

- 277 -

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:28:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 5 (A) LENGTH: 45 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

- 10 (A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:28:

15 GAAGAAGGGA TCCTGGTGCC TCGTGGTTCT GGCCTACAA ATACT 45

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:29:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- 20 (A) LENGTH: 30 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: other nucleic acid

- 25 (A) DESCRIPTION: /desc = "DNA"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:29:

30 CTGGCCTCAA GCTTAACGGA ATTCACCTTT 30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:30:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 25 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:30:

Ala Pro Met Ala Glu Gly Glu Gln Lys Pro Arg Glu Val Val Lys Phe
1 5 10 15
Met Asp Val Tyr Lys Arg Ser Tyr Cys
20 25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:31:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 26 amino acids

- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:31:

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1 5 10 15

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys
20 25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:32:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 25 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:32:

5 Met Ala Ala Gly Ser Ile Thr Thr Leu Pro Ala Leu Pro Glu Gly Gly
1 5 10 15

Asp Gly Gly Ala Phe Ala Pro Gly Cys
20 25

10

- 281 -

CLAIMS

1. A binding ligand comprising:

5 (a) a first binding region that binds to a diseased cell, a component of disease-associated vasculature or a component of disease-associated stroma; the first binding region operatively linked to

10

(b) a coagulation factor or a second binding region that binds to a coagulation factor.

15 2. The binding ligand of claim 1, wherein said first binding region comprises an IgG antibody, an IgM antibody or an antigen binding region of an antibody.

20 3. The binding ligand of claim 2, wherein said first binding region comprises an scFv, Fv, Fab', Fab or F(ab')₂ fragment of an antibody.

25 4. The binding ligand of claim 2, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a tumor cell, a component of tumor vasculature or a component of tumor stroma.

30

5. The binding ligand of claim 4, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a cell surface antigen of a tumor cell.

35

- 282 -

6. The binding ligand of claim 5, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to the cell surface tumor antigen p185^{HER2}, milk mucin core protein, TAG-72, Lewis a,
5 carcinoembryonic antigen (CEA) or a tumor-associated antigen that binds to an antibody selected from the group consisting of 9.2.27, OV-TL3, MOv18, B3, KS1/4, 260F9 and D612.
- 10 7. The binding ligand of claim 4, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a component of tumor vasculature.
- 15 8. The binding ligand of claim 7, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a tumor vasculature cell surface receptor.
- 20 9. The binding ligand of claim 8, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to an MHC Class II protein, a
25 VEGF/VPF receptor, an FGF receptor, a TGF β receptor, a TIE, VCAM-1, P-selectin, E-selectin, $\alpha_v\beta_3$ integrin, pleiotropin, endosialin or endoglin.
- 30 10. The binding ligand of claim 9, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to endoglin.
- 35 11. The binding ligand of claim 10, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an

- 283 -

antibody that binds to the same epitope as the monoclonal antibody TEC-4 or the monoclonal antibody TEC-11.

5 12. The binding ligand of claim 9, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a VEGF receptor.

10 13. The binding ligand of claim 12, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to the same epitope as the monoclonal antibody 3E11, 3E7, 5G6, 4D8 or 10B10.

15 14. The binding ligand of claim 12, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to the same epitope as the monoclonal antibody TEC-110.

20 15. The binding ligand of claim 7, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a ligand that binds to a tumor
25 vasculature cell surface receptor.

30 16. The binding ligand of claim 15, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to VEGF/VPF, FGF, TGF β , a ligand that binds to a TIE, a tumor-associated fibronectin isoform, scatter factor, hepatocyte growth factor (HGF), platelet factor 4 (PF4), PDGF or TIMP.

35

- 284 -

17. The binding ligand of claim 16, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to VEGF/VPF, FGF, TGF β , a ligand that binds to a TIE or a tumor-associated fibronectin isoform.

5

18. The binding ligand of claim 7, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to an inducible tumor vasculature component.

10

19. The binding ligand of claim 18, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a tumor vasculature component inducible by a coagulant.

15

20. The binding ligand of claim 19, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a tumor vasculature component inducible by thrombin.

20

21. The binding ligand of claim 20, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to P-selectin or E-selectin.

25

22. The binding ligand of claim 18, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a tumor vasculature component inducible by a cytokine.

30

35

- 285 -

23. The binding ligand of claim 22, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a tumor vasculature component inducible by a cytokine released by monocytes,
5 macrophages, mast cells, helper T cells, CD8-positive T-cells or NK cells.

24. The binding ligand of claim 22, wherein said first
10 binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a tumor vasculature component inducible by the cytokine IL-1, IL-4, TNF- α , TNF- β or IFN- γ .

15 25. The binding ligand of claim 22, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to E-selectin, VCAM-1, ICAM-1, endoglin or an MHC Class II antigen.

20 26. The binding ligand of claim 25, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to E-selectin.

25 27. The binding ligand of claim 25, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to an MHC Class II antigen.

30 28. The binding ligand of claim 7, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a ligand:receptor complex but does
35 not bind to the ligand or the factor receptor when the ligand or receptor is not in the ligand:receptor complex.

- 286 -

29. The binding ligand of claim 28, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to the same epitope as the monoclonal antibody 2E5, 3E5 or 4E5.

30. The binding ligand of claim 4, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a component of tumor stroma.

31. The binding ligand of claim 30, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to tenascin.

32. The binding ligand of claim 30, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a basement membrane component.

33. The binding ligand of claim 30, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to an activated platelet.

34. The binding ligand of claim 30, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to an inducible tumor stroma component.

35. The binding ligand of claim 34, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an

- 287 -

antibody that binds to a tumor stroma component inducible by a coagulant.

5 36. The binding ligand of claim 35, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a tumor stroma component inducible by thrombin.

10

37. The binding ligand of claim 36, wherein said first binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to RIBS.

15

38. The binding ligand of claim 1, wherein said first binding region comprises a ligand or receptor that binds to a diseased cell or to a component of disease-associated vasculature.

20

39. The binding ligand of claim 38, wherein said first binding region comprises a ligand that binds to a tumor cell surface receptor or a soluble binding domain of a
25 receptor that binds to a ligand that binds to a tumor cell surface molecule.

40. The binding ligand of claim 38, wherein said first
30 binding region comprises a ligand or receptor that binds to a component of tumor vasculature.

41. The binding ligand of claim 40, wherein said first
35 binding region comprises a ligand that binds to a tumor vasculature endothelial cell surface receptor.

- 288 -

42. The binding ligand of claim 41, wherein said first binding region comprises VEGF/VPF, FGF, TGF β , a ligand that binds to a TIE, a tumor-associated fibronectin isoform, scatter factor, hepatocyte growth factor (HGF), platelet factor 4 (PF4), PDGF or TIMP.

43. The binding ligand of claim 42, wherein said first binding region comprises VEGF/VPF.

44. The binding ligand of claim 42, wherein said first binding region comprises FGF.

15

45. The binding ligand of claim 40, wherein said first binding region comprises a soluble binding domain of a receptor that binds to a ligand that binds to a tumor vasculature endothelial cell surface receptor.

46. The binding ligand of claim 45, wherein said first binding region comprises a soluble binding domain of a VEGF/VPF receptor.

25

47. The binding ligand of claim 1, wherein said first binding region is operatively linked to a coagulation factor.

30

48. The binding ligand of claim 47, wherein said coagulation factor comprises the vitamin K-dependent coagulant Factor II/IIa, Factor VII/VIIa, Factor IX/IXa or Factor X/Xa.

35

- 289 -

49. The binding ligand of claim 48, wherein said coagulation factor comprises a vitamin K-dependent coagulation factor lacking the Gla modification.

5

50. The binding ligand of claim 49, wherein said coagulation factor is prepared by expressing a vitamin K-dependent coagulation factor-encoding gene in a procaryotic host cell.

10

51. The binding ligand of claim 49, wherein said coagulation factor is prepared by treating the vitamin K-dependent coagulation factor protein to remove or alter the corresponding Glutamic acid residues.

15

52. The binding ligand of claim 49, wherein said coagulation factor is prepared by preparing an engineered coagulation factor gene that encodes a vitamin K-dependent coagulation factor lacking the corresponding Glutamic acid residues and expressing said engineered gene in a recombinant host cell.

20
25

53. The binding ligand of claim 47, wherein said coagulation factor comprises Tissue Factor or a Tissue Factor derivative.

30

54. The binding ligand of claim 53, wherein said coagulation factor comprises a mutant Tissue Factor deficient in the ability to activate Factor VII.

35

- 290 -

55. The binding ligand of claim 54, wherein said coagulation factor comprises a Tissue Factor that includes a mutation in the amino acid region between about position 157 and about position 167.

5

56. The binding ligand of claim 55, wherein said coagulation factor comprises a mutant Tissue Factor wherein Trp at position 158 is changed to Arg; wherein Ser at position 162 is changed to Ala; wherein Gly at position 164 is changed to Ala; or wherein Trp at position 158 is changed to Arg and Ser at position 162 is changed to Ala.

15

57. The binding ligand of claim 53, wherein said coagulation factor comprises truncated Tissue Factor.

20 58. The binding ligand of claim 57, wherein said coagulation factor comprises dimeric truncated Tissue Factor.

25 59. The binding ligand of claim 47, wherein said coagulation factor comprises Russell's viper venom Factor X activator.

30 60. The binding ligand of claim 47, wherein said coagulation factor comprises a platelet-activating compound.

- 291 -

61. The binding ligand of claim 60, wherein said coagulation factor comprises thromboxane A₂ or thromboxane A₂ synthase.

5

62. The binding ligand of claim 47, wherein said coagulation factor comprises an inhibitor of fibrinolysis.

10

63. The binding ligand of claim 62, wherein said coagulation factor comprises α 2-antiplasmin.

15

64. The binding ligand of claim 1, wherein said first binding region is operatively linked to a second binding region that binds to a coagulation factor.

20

65. The binding ligand of claim 64, further comprising a coagulation factor bound to said second binding region.

25

66. The binding ligand of claim 64, wherein said second binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a coagulation factor.

30

67. The binding ligand of claim 66, wherein said second binding region comprises an IgG antibody, an IgM antibody, or a scFv, Fv, Fab', Fab or F(ab')₂ fragment of an antibody.

35

68. The binding ligand of claim 66, wherein said second binding region comprises an antigen binding region of an

- 292 -

antibody that binds to the vitamin K-dependent coagulant Factor II/IIa, Factor VII/VIIa, Factor IX/IXa or Factor X/Xa.

5

69. The binding ligand of claim 68, wherein said second binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a vitamin K-dependent coagulation factor that lacks the Gla modification.

10

70. The binding ligand of claim 66, wherein said second binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to Tissue Factor.

15

71. The binding ligand of claim 70, wherein said second binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to a mutant Tissue Factor.

20

72. The binding ligand of claim 70, wherein said second binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to truncated Tissue Factor.

25

73. The binding ligand of claim 72, wherein said second binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to dimeric truncated Tissue Factor.

30

74. The binding ligand of claim 66, wherein said second binding region comprises an antigen binding region of an antibody that binds to Russell's viper venom Factor X activator, thromboxane A₂ or α 2-antiplasmin.

35

- 293 -

75. The binding ligand of claim 1, wherein said first binding region is operatively linked to said coagulation factor or said second binding region via a covalent bond.

5

76. The binding ligand of claim 75, wherein said first binding region is operatively linked to said coagulation factor or said second binding region via a chemical cross-linker.

10

77. The binding ligand of claim 75, wherein said binding ligand is a fusion protein prepared by expressing a recombinant vector in a host cell, wherein the vector comprises, in the same reading frame, a DNA segment encoding said first binding region operatively linked to a DNA segment encoding said coagulation factor or second binding region.

20

78. The binding ligand of claim 1, wherein said first binding region is operatively linked to said coagulation factor or said second binding region using an avidin:biotin combination.

25

79. The binding ligand of claim 1, further defined as a bispecific antibody comprising a first antigen binding region that binds to a tumor cell, a component of tumor-associated vasculature or a component of tumor-associated stroma, the first antigen binding region operatively linked to a second antigen binding region that binds to a coagulation factor.

35

- 294 -

80. The binding ligand of claim 79, further defined as an IgG antibody, an IgM antibody or an scFv, Fv, Fab', Fab or F(ab')₂ fragment of a bispecific antibody.

5

81. The binding ligand of claim 79, further defined as a bispecific antibody comprising a first antigen binding region that binds to an MHC Class II protein operatively linked to a second antigen binding region that binds to truncated Tissue Factor.

10

82. A binding ligand comprising:

15

(a) a first binding region that binds to a tumor cell, a component of tumor-associated vasculature or a component of tumor-associated stroma; the first binding region operatively linked to

20

(b) an engineered coagulation factor or a second binding region that binds to an engineered coagulation factor.

25

83. The binding ligand of claim 82, wherein said engineered coagulation factor is a vitamin K-dependent coagulant that lacks the Gla modification.

30

84. The binding ligand of claim 83, wherein said engineered coagulation factor is Factor II/IIa, Factor VII/VIIa, Factor IX/IXa or Factor X/Xa that lacks the Gla modification.

35

- 295 -

85. The binding ligand of claim 83, wherein said engineered coagulation factor is prepared by expressing a vitamin K-dependent coagulation factor gene in a procaryotic host cell.

5

86. The binding ligand of claim 83, wherein said engineered coagulation factor is prepared by treating the vitamin K-dependent coagulation factor protein to remove or alter the corresponding Glutamic acid residues.

10

87. The binding ligand of claim 83, wherein said engineered coagulation factor is prepared by preparing an engineered coagulation factor gene that encodes a vitamin K-dependent coagulation factor lacking the corresponding Glutamic acid residues and expressing said engineered gene in a recombinant host cell.

15

20

88. The binding ligand of claim 82, wherein said engineered coagulation factor is a Tissue Factor construct comprising a first Tissue Factor or derivative operatively linked to a second Tissue Factor or derivative.

25

89. The binding ligand of claim 88, wherein said Tissue Factor construct comprises a truncated Tissue Factor.

30

90. The binding ligand of claim 89, wherein said Tissue Factor construct comprises a hydrophobic membrane insertion moiety.

35

- 296 -

91. The binding ligand of claim 90, wherein said Tissue Factor construct comprises a truncated Tissue Factor that includes a stretch of between about 3 and about 20 hydrophobic amino acids.

5

92. The binding ligand of claim 91, wherein said Tissue Factor construct comprises a truncated Tissue Factor that includes a stretch of hydrophobic amino acids located at the N- or C-terminus of the truncated Tissue Factor.

10

93. The binding ligand of claim 90, wherein said Tissue Factor construct comprises a truncated Tissue Factor that includes a fatty acid.

15

94. The binding ligand of claim 90, wherein said Tissue Factor construct comprises two truncated Tissue Factors, each of which includes a membrane insertion moiety.

20

95. The binding ligand of claim 88, wherein said Tissue Factor construct comprises a first and second Tissue Factor or derivative operatively linked via a disulfide, thioether or peptide bond.

25

96. The binding ligand of claim 82, wherein said first binding region is operatively linked to a second binding region that binds to an engineered coagulation factor.

30

97. The binding ligand of claim 82, wherein said first binding region is operatively linked to an engineered coagulation factor.

35

- 297 -

98. The binding ligand of claim 97, wherein said first binding region is linked to said engineered coagulation factor via a biologically-releasable bond.

5

99. The binding ligand of claim 98, wherein said first binding region is linked to said engineered coagulation factor via a selectively-cleavable peptide bond.

10

100. The binding ligand of claim 99, wherein said first binding region is linked to said engineered coagulation factor via a peptide linker that includes a cleavage site for urokinase, plasmin, Thrombin, Factor IXa, Factor Xa or a metalloproteinase.

15

101. A Tissue Factor construct comprising a first Tissue Factor or derivative operatively linked to a second Tissue Factor or derivative.

20

102. The Tissue Factor construct of claim 101, comprising an operatively linked first, second and third Tissue Factor or Tissue Factor derivative.

25

103. The Tissue Factor construct of claim 102, comprising about five operatively linked Tissue Factors or Tissue Factor derivatives.

30

104. The Tissue Factor construct of claim 103, comprising about ten operatively linked Tissue Factors or Tissue Factor derivatives.

35

- 298 -

105. The Tissue Factor construct of claim 104, comprising about twenty operatively linked Tissue Factors or Tissue Factor derivatives.

5

106. The Tissue Factor construct of claim 101, comprising a truncated Tissue Factor.

10

107. The Tissue Factor construct of claim 106, comprising a truncated Tissue Factor that includes a hydrophobic membrane insertion moiety.

15

108. The Tissue Factor construct of claim 107, comprising a truncated Tissue Factor that includes a stretch of between about 3 and about 20 hydrophobic amino acids.

20

109. The Tissue Factor construct of claim 108, comprising a truncated Tissue Factor that includes a stretch of hydrophobic amino acids located at the N- or C-terminus of the truncated Tissue Factor.

25

110. The Tissue Factor construct of claim 107, comprising a truncated Tissue Factor that includes a fatty acid.

30

111. The Tissue Factor construct of claim 107, comprising two truncated Tissue Factors, each of which includes a hydrophobic membrane insertion moiety.

35

- 299 -

112. The Tissue Factor construct of claim 101, comprising a truncated Tissue Factor modified to contain a terminal cysteine residue.

5

113. The Tissue Factor construct of claim 112, comprising two truncated Tissue Factors, each of which is modified to contain a terminal cysteine residue.

10

114. The Tissue Factor construct of claim 112, further comprising an antibody or an antigen binding region of an antibody operatively linked to said cysteine residue.

15

115. The Tissue Factor construct of claim 106, comprising a truncated Tissue Factor modified to contain a selectively cleavable peptide linker.

20

116. The Tissue Factor construct of claim 115, wherein said selectively cleavable peptide linker includes a cleavage site for urokinase, plasmin, Thrombin, Factor IXa, Factor Xa or a metalloproteinase.

25

117. The Tissue Factor construct of claim 116, wherein said selectively cleavable peptide linker includes a cleavage site for an interstitial collagenase, a gelatinase or a stromelysin.

30

118. The Tissue Factor construct of claim 115, further comprising an antibody or an antigen binding region of an antibody operatively linked to said selectively cleavable peptide linker.

35

- 300 -

119. The Tissue Factor construct of claim 101, comprising an operatively linked series of units in the sequence: a cysteine residue, a selectively cleavable peptide linker, a stretch of hydrophobic amino acids, a first truncated
5 Tissue Factor and a second truncated Tissue Factor.

120. The Tissue Factor construct of claim 119, comprising an operatively linked series of units in the sequence: a
10 first cysteine residue, a selectively cleavable peptide linker, a first stretch of hydrophobic amino acids, a first truncated Tissue Factor, a second truncated Tissue Factor and a second stretch of hydrophobic amino acids.

15

121. The Tissue Factor construct of claim 119, further comprising an antibody or an antigen binding region of an antibody operatively linked to said cysteine residue.

20

122. A pharmaceutical composition comprising, in a pharmacologically acceptable form, a binding ligand that comprises:

25

(a) a first binding region that binds to a diseased cell, a component of disease-associated vasculature or a component of disease-associated stroma; the first binding region operatively linked to

30

(b) a coagulation factor or a second binding region that binds to a coagulation factor.

- 301 -

123. The pharmaceutical composition of claim 122, wherein said binding ligand comprises a first binding region covalently linked to a coagulation factor.

5

124. The pharmaceutical composition of claim 122, wherein said binding ligand comprises a first binding region covalently linked to a second binding region that binds to a coagulation factor.

10

125. The pharmaceutical composition of claim 124, wherein said binding ligand further comprises a coagulation factor non-covalently bound to said second binding region.

15

126. The pharmaceutical composition of claim 124, wherein said binding ligand is a bispecific antibody.

20

127. The pharmaceutical composition of claim 122, wherein said first binding region is operatively linked to Tissue Factor, a Tissue Factor derivative or an antigen binding region of an antibody that binds to Tissue Factor or a Tissue Factor derivative.

25

- 302 -

128. A kit comprising, in suitable container means:

- 5 (a) a first pharmaceutical composition comprising a biological agent capable of inducing the expression of a target antigen in disease-associated vasculature or disease-associated stroma; and
- 10 (b) a second pharmaceutical composition comprising a binding ligand that comprises
- 15 (i) a first binding region that binds to an inducible target antigen of disease-associated vasculature or disease-associated stroma, the first binding region operatively linked to
- 20 (ii) a coagulation factor or a second binding region that binds to a coagulation factor.

129. The kit of claim 128, wherein said first pharmaceutical composition comprises a biological agent capable of inducing the expression of a target antigen on
25 a disease-associated vascular endothelial cell.

130. The kit of claim 128, wherein said first pharmaceutical composition comprises a bispecific
30 antibody that binds to an activating antigen on the cell surface of a leukocyte cell and to a tumor antigen on the cell surface of a tumor cell of a vascularized tumor.

35 131. The kit of claim 130, wherein said first pharmaceutical composition comprises a bispecific

- 303 -

antibody that binds to the activating antigen CD2, CD3, CD14, CD16 (FcR for IgE), CD28 or the T-cell receptor antigen.

5

132. The kit of claim 131, wherein said first pharmaceutical composition comprises a bispecific antibody that binds to CD14 and induces the expression of IL-1 by monocyte/macrophage cells.

10

133. The kit of claim 132, wherein said second pharmaceutical composition comprises a binding ligand that comprises a first binding region that binds to E-selectin.

15

134. The kit of claim 131, wherein said first pharmaceutical composition comprises a bispecific antibody that binds to CD28 and induces the expression of IFN- γ by T-cells.

20

135. The kit of claim 134, wherein said second pharmaceutical composition comprises a binding ligand that comprises a first binding region that binds to an MHC Class II antigen.

25

136. The kit of claim 134, further comprising a third pharmaceutical composition comprising an agent capable of suppressing MHC Class II antigen expression in the vascular endothelial cells of normal tissues.

30
35

- 304 -

137. The kit of claim 136, further comprising a third pharmaceutical composition comprising a cyclosporin.

5 138. The kit of claim 130, wherein said first pharmaceutical composition comprises a bispecific antibody that binds to the tumor antigen p185^{HER2}, milk
mucin core protein, TAG-72, Lewis a, carcinoembryonic
antigen (CEA) or a tumor-associated antigen that binds to
10 an antibody selected from the group consisting of 9.2.27, OV-TL3, MOv18, B3, KS1/4, 260F9 and D612.

139. The kit of claim 128, wherein said first
15 pharmaceutical composition comprises a biological agent capable of inducing the expression of a target antigen in a disease-associated stromal component.

20 140. The kit of claim 139, wherein said first pharmaceutical composition comprises a bispecific antibody that binds to a tumor cell or a component of tumor stroma and to Tissue Factor, a Tissue Factor
derivative, prothrombin, Factor VII/VIIa, Factor IX/IXa,
25 Factor X/Xa, Factor XI/XIa or Russell's viper venom Factor X activator.

141. The kit of claim 140, wherein said second
30 pharmaceutical composition comprises a binding ligand that comprises a first binding region that binds to P-selectin.

35 142. The kit of claim 140, wherein said second pharmaceutical composition comprises a binding ligand

- 305 -

that comprises a first binding region that binds to E-selectin.

- 5 143. The use of a binding ligand in the preparation of a medicament for delivering a coagulation factor to disease-associated vasculature, the binding ligand comprising:
- 10 (a) a first binding region that binds to a diseased cell, a component of disease-associated vasculature or a component of disease-associated stroma, the first binding region operatively linked to
- 15 (b) coagulation factor or a second binding region that binds to a coagulation factor.
- 20 144. A use according to claim 143, wherein said binding ligand is used in the preparation of a medicament for delivering an exogenous coagulation factor to disease-associated vasculature, the binding ligand comprising a
- 25 first binding region covalently linked to a coagulation factor.
145. A use according to claim 143, wherein said binding ligand is used in the preparation of a medicament for
- 30 delivering an exogenous coagulation factor to disease-associated vasculature, the binding ligand comprising a first binding region covalently linked to a second binding region that is non-covalently bound to a coagulation factor.

35

- 306 -

146. A use according to claim 143, wherein said binding ligand is used in the preparation of a medicament for delivering an endogenous coagulation factor to disease-associated vasculature, the binding ligand comprising a first binding region covalently linked to a second binding region that binds to endogenous coagulation factor and concentrates said factor at said disease-associated vasculature upon administration of said medicament to said animal.
147. A use according to claim 143, wherein said medicament is intended for use in treating Benign Prostatic Hyperplasia (BPH), diabetic retinopathy, vascular restenosis, arteriovenous malformations (AVM), hemangioma, neovascular glaucoma, rheumatoid arthritis or psoriasis.
148. A use according to claim 143, wherein said medicament is intended for use in treating an animal with a vascularized tumor.
149. A use according to claim 148, wherein said medicament is intended for use after inducing the expression of a targetable component in tumor-associated vasculature or tumor-associated stroma of an animal, wherein said medicament comprises a binding ligand that comprises a first binding region that binds to the induced targetable component.
150. A use according to claim 149, wherein the expression of the targetable component in tumor-associated vasculature is induced by a cytokine.

- 307 -

151. A use according to claim 150, wherein the expression of the targetable component in tumor-associated vasculature is induced by a cytokine released by leukocyte cells of the animal.

152. A use according to claim 151, wherein the expression of the targetable component in tumor-associated vasculature is induced by a cytokine released by monocytes, macrophages, mast cells, helper T cells, CD8-positive T-cells or NK cells of the animal.

153. A use according to claim 151, wherein the expression of the targetable component in tumor-associated vasculature is induced by the cytokine IL-1, IL-4, TNF- α , TNF- β or IFN- γ .

154. A use according to claim 151, wherein the leukocyte cells of the animal are activated to release the cytokine by administering to the animal a pharmaceutical composition comprising an activating antibody that binds to a leukocyte cell surface activating antigen.

155. A use according to claim 154, wherein the activating antibody binds to the leukocyte cell surface activating antigen CD2, CD3, CD14, CD16, FcR for IgE, CD28 or the T-cell receptor antigen.

156. A use according to claim 154, wherein the activating antibody is a bispecific antibody that binds to and

- 308 -

cross-links activated leukocytes and tumor cells within the animals' tumor.

- 5 157. A use according to claim 156, wherein the activating antibody is a bispecific antibody that binds to CD14 or CD28, and to a cell surface antigen of a tumor cell.
- 10 158. A use according to claim 150, wherein the expression of E-selectin, VCAM-1, ICAM-1, endoglin or an MHC Class II antigen is induced in tumor-associated vasculature.
- 15 159. A use according to claim 158, wherein the expression of E-selectin is induced in tumor-associated vasculature.
- 20 160. A use according to claim 158, wherein the expression of an MHC Class II antigen is induced in tumor-associated vasculature.
- 25 161. A use according to claim 160, wherein the expression of MHC Class II antigens by endothelial cells in the animal's normal tissues is suppressed by administering cyclosporin to the animal; and MHC Class II antigen expression in tumor-associated vasculature is subsequently induced by administering to the animal a
- 30 bispecific antibody that binds to CD28 and to a cell surface antigen of a tumor cell.
- 35 162. A use according to claim 160, wherein the expression of MHC Class II antigens by endothelial cells in the animal's normal tissues is suppressed by administering to

- 309 -

the animal an anti-CD4 antibody that suppresses IFN- γ production in the T cells of the animal; and MHC Class II antigen expression in tumor-associated vasculature is subsequently induced by administering to the animal an IFN- γ -producing T cell clone that binds to an antigen in the disease site.

163. A use according to claim 162, wherein the IFN- γ -producing T cell clone is prepared by a method that includes the steps of:

- (a) removing a tissue section from the disease site of the animal;
- (b) extracting infiltrating leukocytes from the disease site; and
- (c) expanding the infiltrating leukocytes *in vitro* to provide the IFN- γ producing clone.

164. A use according to claim 149, wherein the expression of the targetable component in tumor-associated vasculature is induced by thrombin.

165. A use according to claim 164, wherein the production of thrombin is induced by administering to the animal a pharmaceutical composition comprising a bispecific antibody that binds to a tumor cell or a component of tumor stroma and to Tissue Factor, a Tissue Factor derivative, prothrombin, Factor VII/VIIa, Factor IX/IXa, Factor X/Xa, Factor XI/XIa or Russell's viper venom Factor X activator.

- 310 -

166. A use according to claim 164, wherein the expression of P-selectin is induced in tumor-associated vasculature.

5 167. A use according to claim 164, wherein the expression of E-selectin is induced in tumor-associated vasculature.

10 168. The use of a coagulative binding ligand in the preparation of a medicament for treating cancer, the binding ligand comprising:

15 (a) a first binding region that binds to a tumor cell, a component of tumor-associated vasculature or a component of tumor-associated stroma, the first binding region operatively linked to

20 (b) a coagulation factor or a second binding region that binds to a coagulation factor.

25 169. A use according to claim 168, wherein said medicament is formulated for parenteral administration.

30 170. A use according to claim 168, wherein said medicament is formulated for injection into a vascularized tumor site.

35 171. A use according to claim 168, wherein said medicament is suitable for use in a human patient.

- 311 -

172. A use according to claim 168, wherein said
coagulative binding ligand comprises a first binding
region operatively linked to Tissue Factor, truncated
Tissue Factor, dimeric Tissue Factor or an antigen
5 binding region of an antibody that binds to Tissue Factor
or a Tissue Factor derivative.

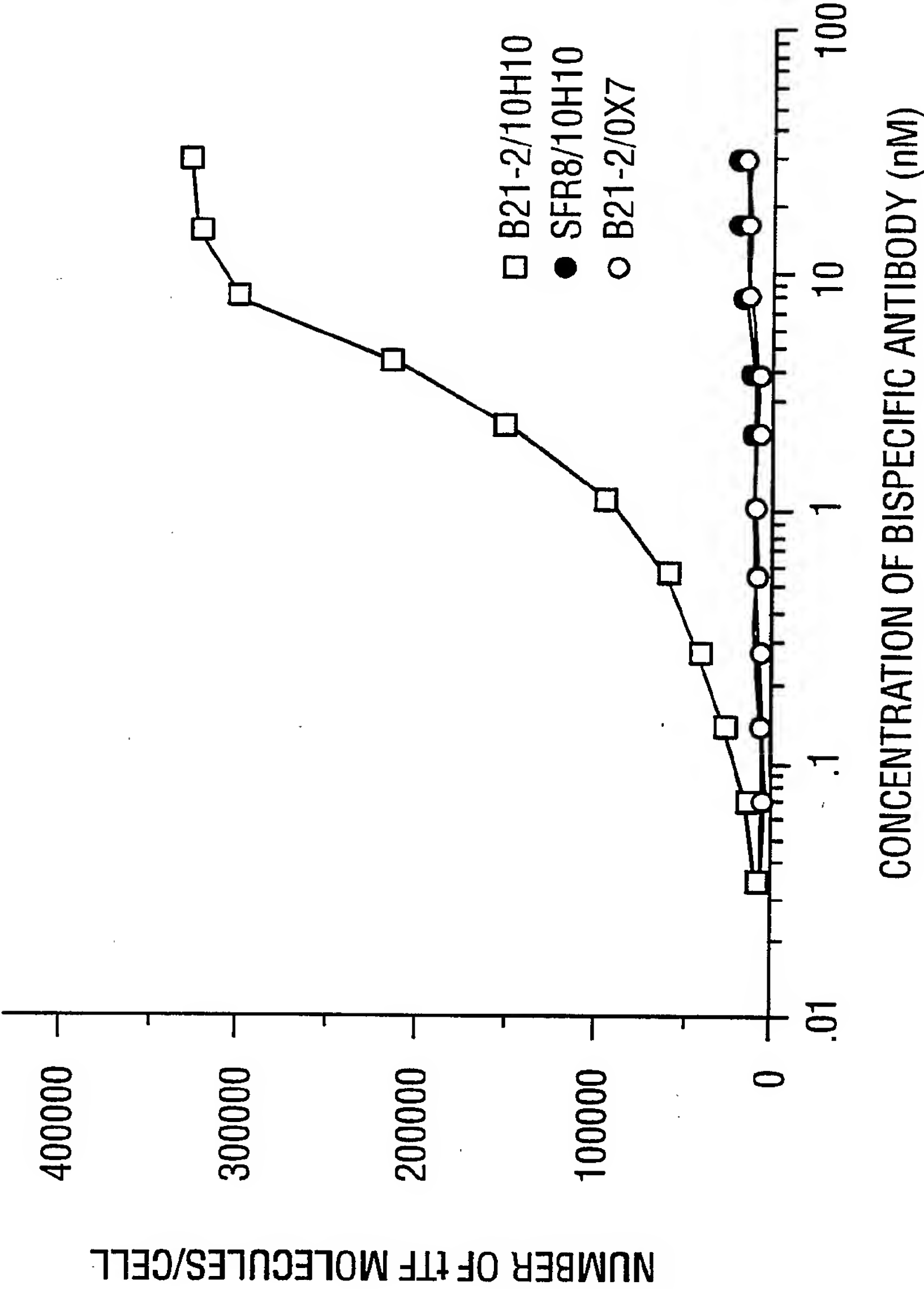


FIG. 1

2/8

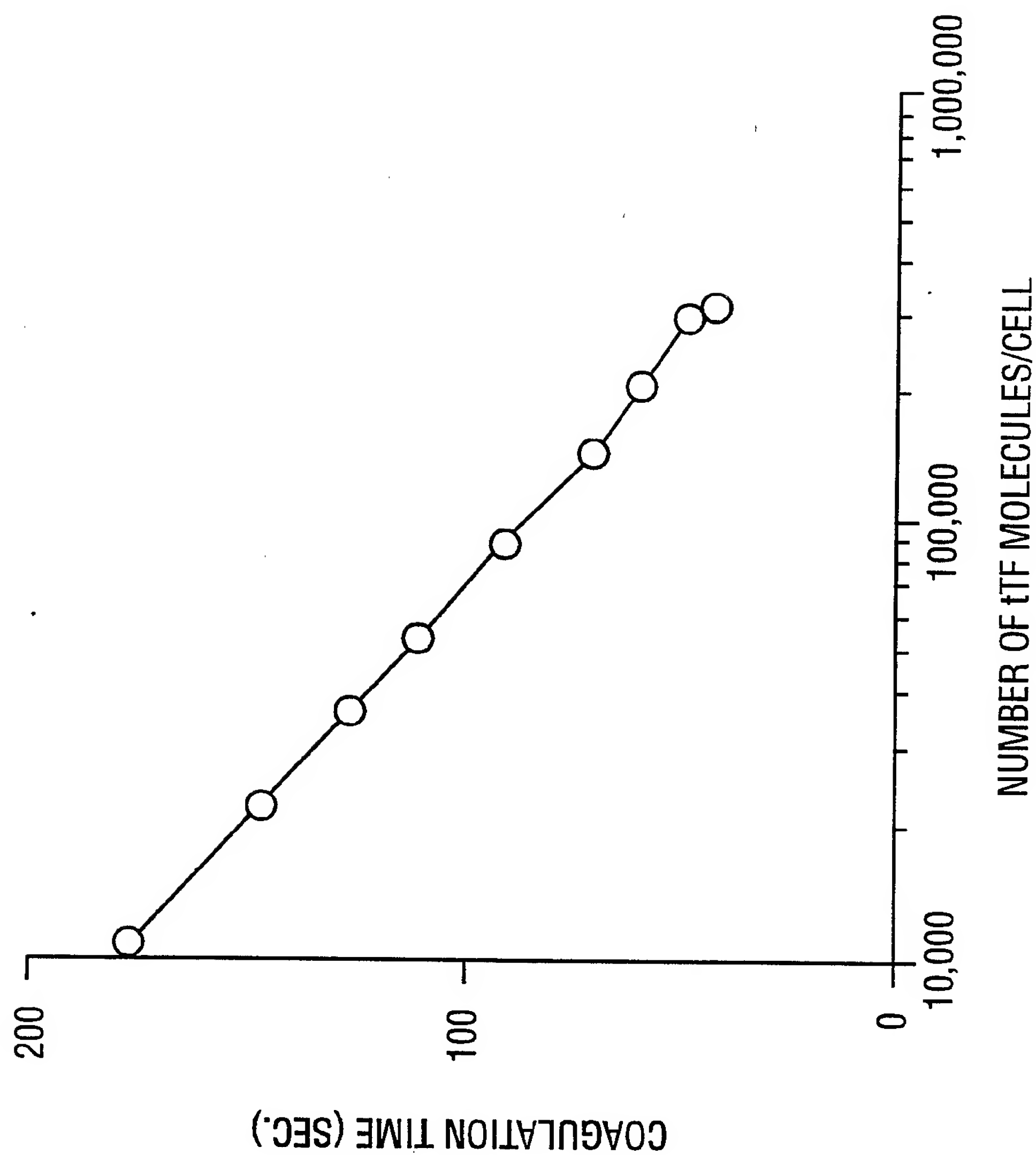


FIG. 2

FIG. 3B



FIG. 3D

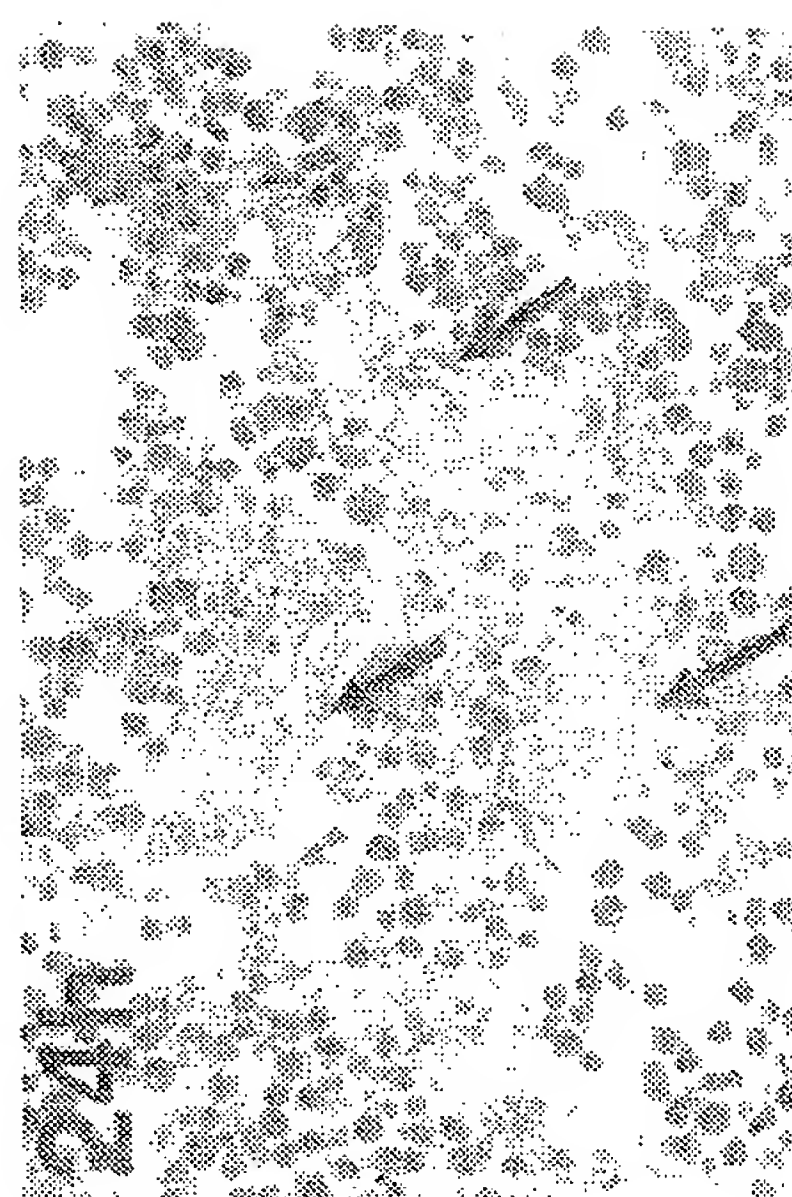
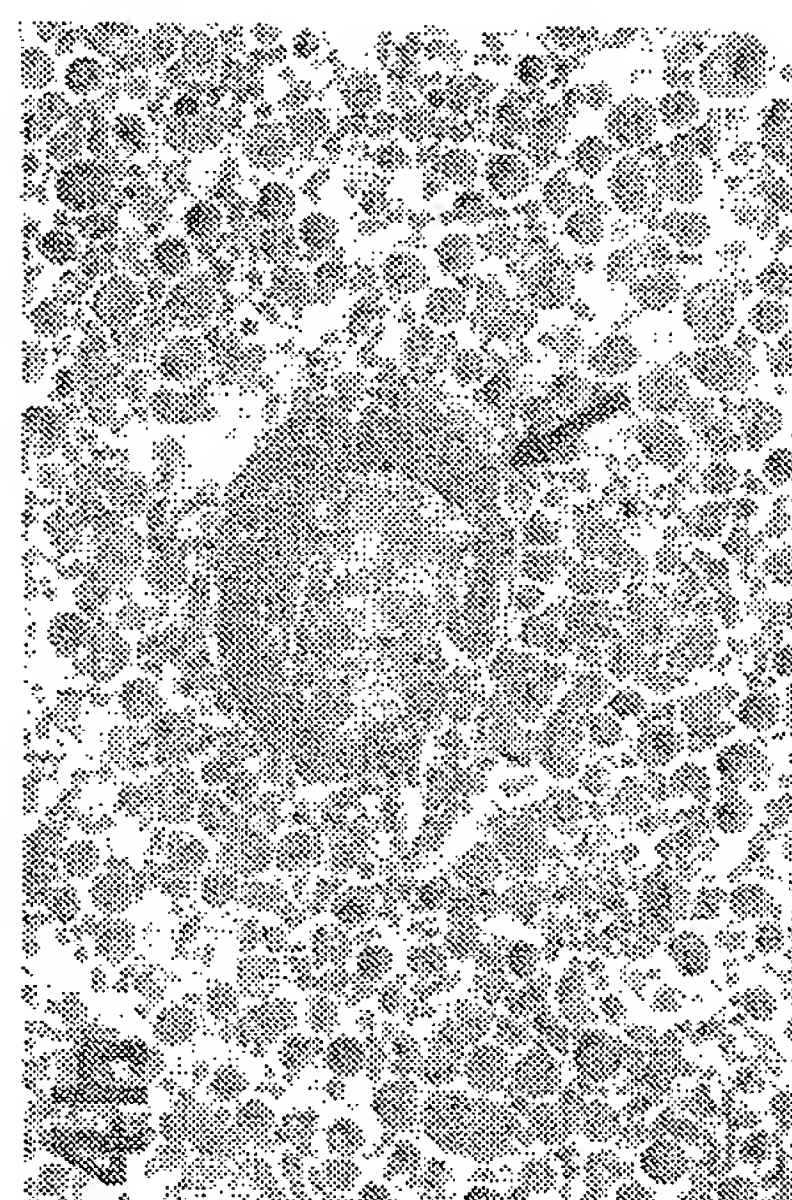


FIG. 3A



FIG. 3C



4/8

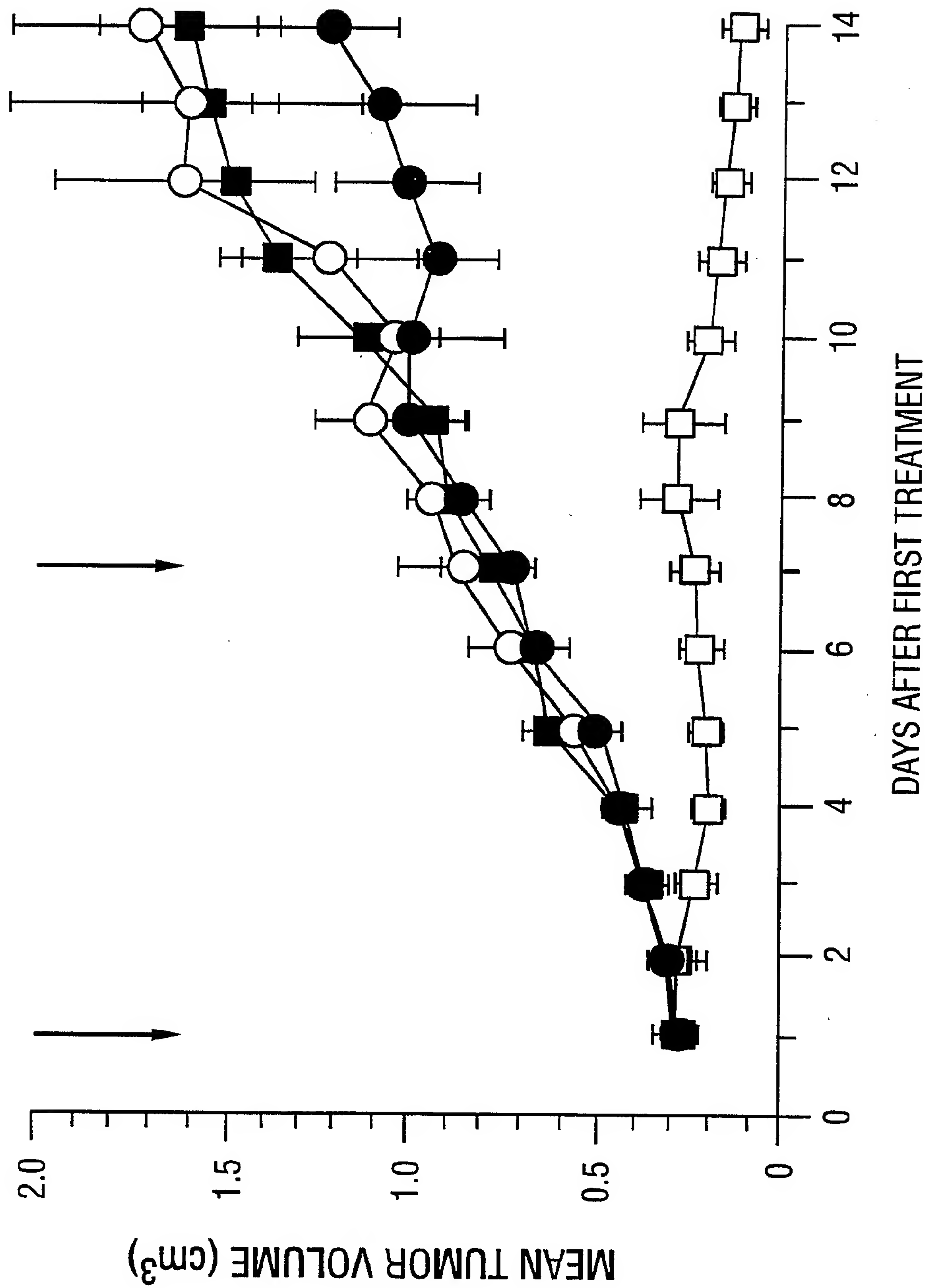


FIG. 4

5/8

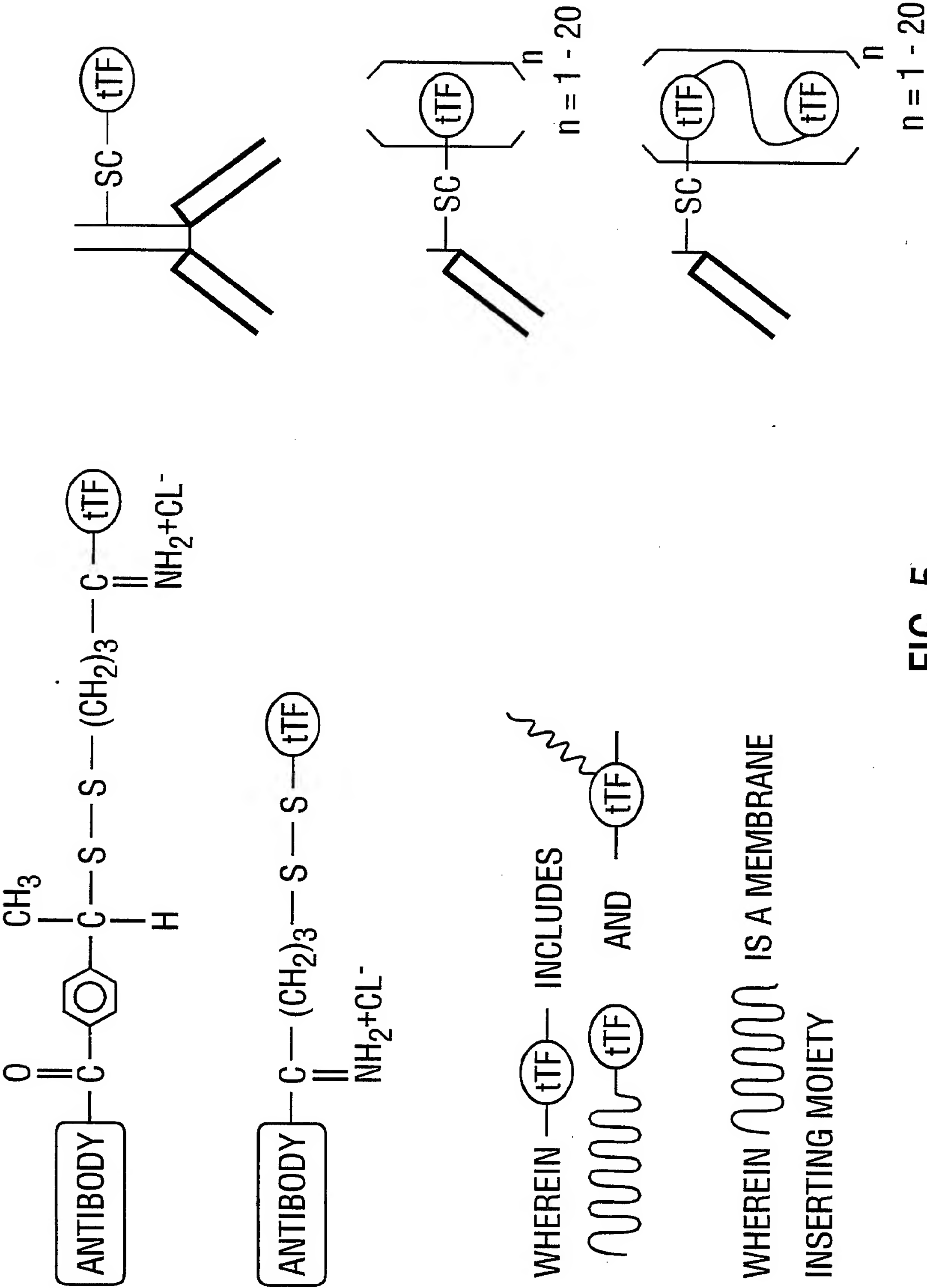


FIG. 5

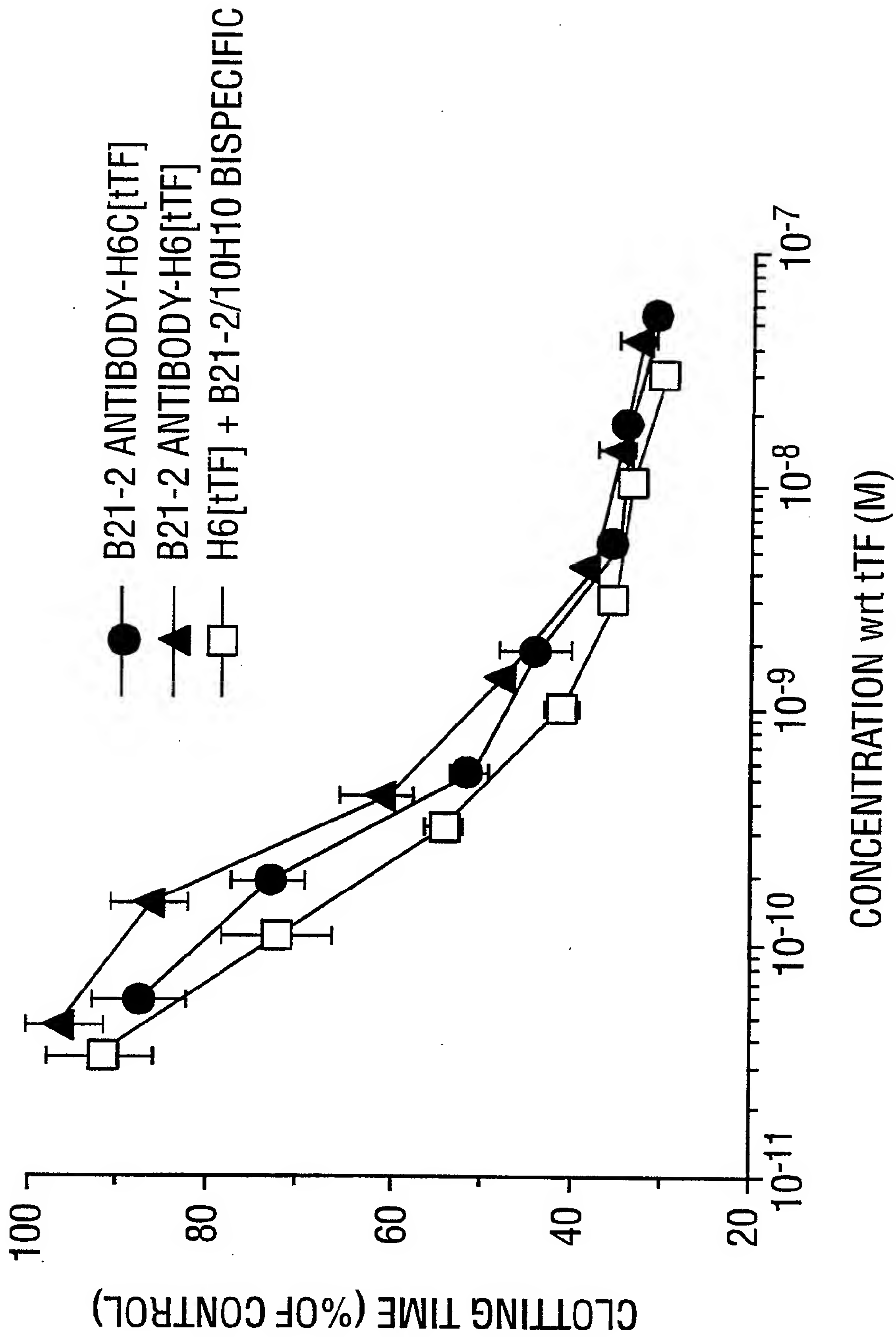


FIG. 6

7/8

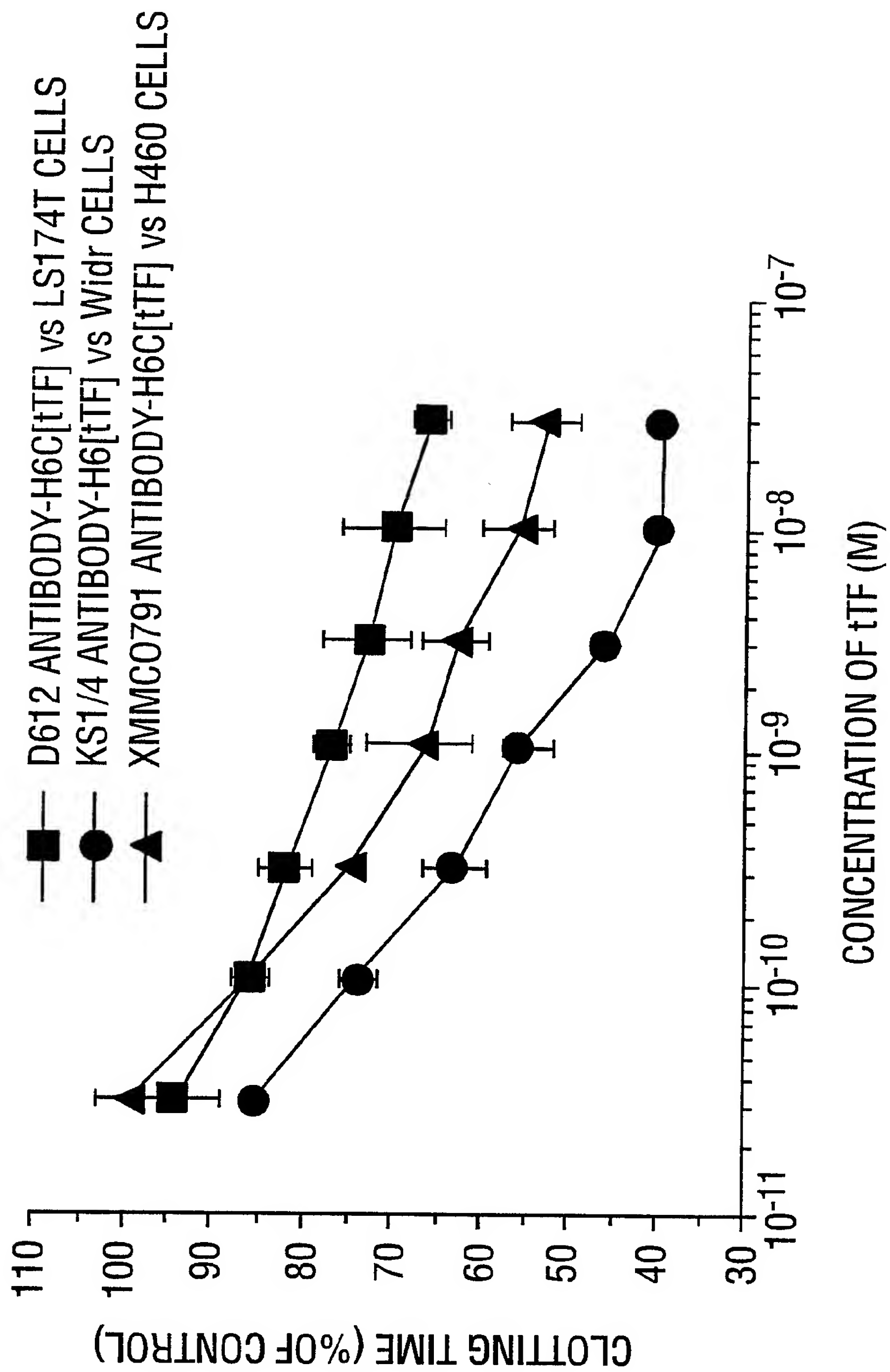


FIG. 7

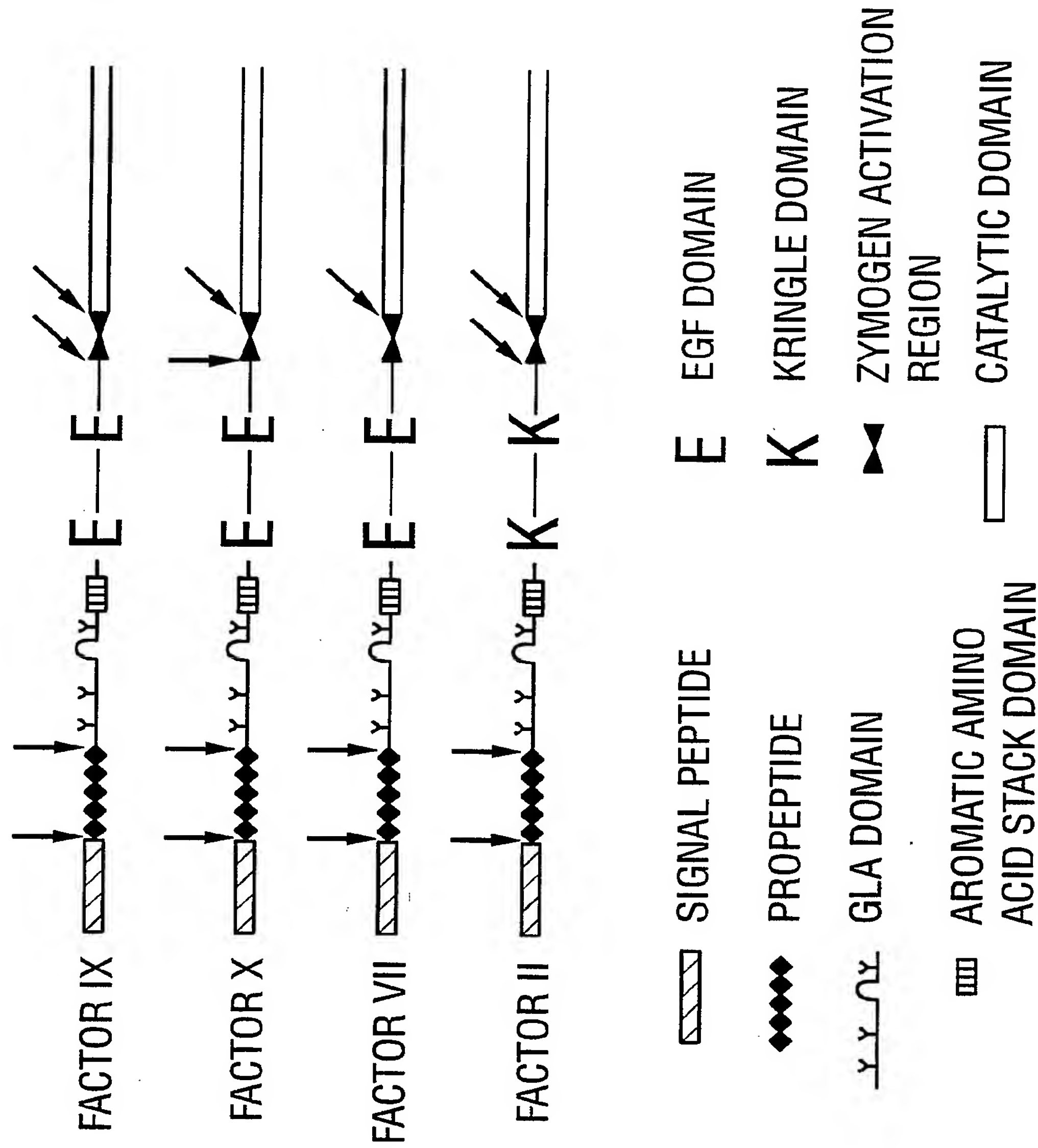


FIG. 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 95/07439

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,81 01145 (UNIV ILLINOIS) 30 April 1981 see claims 1-3	
X	WO,A,93 17715 (UNIV TEXAS ;IMP CANCER RES TECH (GB)) 16 September 1993 cited in the application see claims 1,11,12,16,28,33-36,44 see claims 45,46,54,55; example 1; table II	1-172
X	WO,A,94 05328 (SCRIPPS RESEARCH INST ;RUF WOLFRAM (US); MUELLER BARBARA M (US); R) 17 March 1994 see page 35, line 18 - line 29; claims see page 6, line 10 - line 21	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 1995

Date of mailing of the international search report

24.11.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intel nal Application No
PCT/US 95/07439

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CANCER RESEARCH, vol. 52, 1 November 1992 MD US, pages 5954-5962, F. J. BURROWS 'A MURINE MODEL FOR ANTIBODY-DIRECTED TARGETING OF VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS IN SOLID TUMORS.' See page 5954, abstract ---</p>	1-172
X	<p>DATABASE EMBASE ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL an=95256834, see abstract & BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, vol. 36, no. 2, 1995 pages 237-251, THORPE P.E. ET AL. 'ANTIBODY-DIRECTED TARGETING OF THE VASCULATURE OF SOLID TUMORS.' ---</p>	1-5, 7-11, 18, 143, 148-151, 158, 168-172
Y	<p>J. BIOL. CHEM. (1990), 265(12), 7078-83 CODEN: JBCHA3; ISSN: 0021-9258, 1990 CLAUSS, MATTHIAS ET AL 'A polypeptide factor produced by fibrosarcoma cells that induces endothelial tissue factor and enhances the procoagulant response to tumor necrosis factor/cachectin' see page 7083, column 1, paragraph 3 see page 7078, abstract ---</p>	1-172
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 117, no. 11, 14 September 1992 Columbus, Ohio, US; abstract no. 109988, YAMAZAKI, HIROH ET AL 'Bispecific monoclonal antibodies with specificities for activated platelets and thrombolytic agents, their production and use' see abstract & CA, A, 2 039 259 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD., JAPAN; TOKYO METROPOLITAN INSTITUTE O) ---</p>	1
Y	<p>JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 28, no. 1, January 1994 AMSTERDAM NL, pages 195-202, F.J. BURROWS ET AL. 'TARGETING THE VASCULATURE OF SOLID TUMORS.' see the whole document ---</p>	1-172
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 95/07439

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO,A,93 08210 (BETH ISRAEL HOSPITAL ASSOCIATION) 29 April 1993 see page 1, line 4 - line 7 see page 1, line 19 - line 31 see page 2, line 6 - line 25 see page 3, line 1 - line 9 see page 4, line 7 - line 13 see page 4, line 24; claims 1,12,13 -----</p>	1-172

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 95/07439

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-172
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
PLEASE SEE ATTACHED SHEET ./.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/210

MEANINGFUL SEARCH NOT POSSIBLE...

2. Obscurities, Inconsistencies, etc...

In view of the large number of compounds which are defined by the binding ligands of claim 1,82,122,128,143,168 and also in view of the definition of products by means of their biological, chemical or/and pharmacological properties, the search has to be restricted for economic reasons.

The search was limited to the compounds for which pharmacological data was given and/or the compounds mentioned in the claims or examples. (PCT SEARCH GUIDELINES, Chapter III, paragraph 3.7)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 95/07439

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8101145	30-04-81	CA-A- 1158557 EP-A- 0038357	13-12-83 28-10-81
WO-A-9317715	16-09-93	CA-A- 2131528 EP-A- 0627940	16-09-93 14-12-94
WO-A-9405328	17-03-94	AU-B- 5093593	29-03-94
WO-A-9308210	29-04-93	AU-A- 2861692 PT-A- 100975 ZA-A- 9208014	21-05-93 28-02-94 26-04-93